



SKRIPSI - TK 141581

**PEMBUATAN *CHITOSAN* NANOPARTIKEL UNTUK
IMOBILISASI ENZIM DALAM RANGKA PRODUKSI
GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA**

**Disusun oleh :
Viktor Adrian
2313 100 022**

**Raja Panal Simanullang
2313 100 124**

**Dosen Pembimbing :
Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017**



FINAL PROJECT - TK 141581

**PREPARATION OF NANOPARTICLE CHITOSAN FOR
ENZYME IMMOBILIZATION IN PURPOSE OF
REDUCTION SUGAR PRODUCTION FROM
COCONUT HUSK**

**By :
Viktor Adrian
2313 100 022**

**Raja Panal Simanullang
2313 100 124**

**Advisor :
Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
NIP. 1966 05 23 1991 02 1001**

**DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN

PEMBUATAN *CHITOSAN* NANOPARTIKEL UNTUK IMOBILISASI ENZIM DALAM RANGKA PRODUKSI GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Departemen Teknik Kimia
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh :

Viktor Adrian


NRP : 2313 100 022

Raja Panal Simanullang


NRP : 2313 100 124

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :


1. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

 (Pembimbing I)

2. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng

 (Penguji I)

3. Hakun Wirawasista A., S.T.,
MMT, Ph.D

 (Penguji II)



Surabaya

Juli, 2017

PEMBUATAN *CHITOSAN* NANOPARTIKEL UNTUK IMOBILISASI ENZIM DALAM RANGKA PRODUKSI GULA REDUKSI DARI SABUT KELAPA

Nama : 1. Viktor Adrian (2313 100 022)
2. Raja Panal S. (2313 100 124)
Departemen : Teknik Kimia FTI-ITS
Dosen Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng.

ABSTRAK

Sabut kelapa mengandung lignoselulosa sehingga dapat dihidrolisis menjadi gula reduksi. Hidrolisis enzimatis lignoselulosa menghasilkan gula reduksi lebih besar, selektifitas lebih tinggi, membutuhkan lebih sedikit energi, dan ramah lingkungan. Akan tetapi harga enzim murni yang mahal dan sifat enzim yang sulit dipisahkan menjadi kendala. Hal ini dapat diatasi dengan mengimobilisasi enzim pada material pendukung *chitosan* sehingga enzim dapat dipakai berulang kali. *Chitosan* dipilih karena murah, inert, hidrofilik, dan material pendukung yang *biocompatible*. Tetapi masalah hambatan transfer massa muncul karena sabut kelapa dan *chitosan* keduanya *insoluble* serta pemisahan antara enzim terimobilisasi dan substrat menjadi sulit. Untuk mengatasi masalah hambatan transfer massa digunakan material pendukung dengan ukuran nano. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pembuatan *chitosan* nanopartikel sebagai material pendukung pada enzim selulase terimobilisasi untuk menghasilkan gula reduksi dari limbah sabut kelapa dengan hidrolisis enzimatis. Pada penelitian ini *chitosan* nanopartikel disiapkan menggunakan metode *ionotropic gelation* dengan *gelation agent* natrium sulfat. Dari hasil analisis TEM (*Transmission Electron Microscopy*) diketahui *chitosan* nanopartikel yang diperoleh berukuran antara kurang dari 20 nm hingga lebih dari 200 nm, dengan jumlah terbanyak berukuran

kurang dari 20 nm. Massa *chitosan* nanopartikel yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh volume *buffer* fosfat tiap sekali pencucian. Kemudian dilakukan imobilisasi enzim selulase dengan *chitosan* nanopartikel menggunakan metode kovalen. Jumlah protein enzim selulase yang terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel dianalisis dengan metode Bradford yaitu sebesar 66,5380%. Selanjutnya dilakukan hidrolisis enzimatik sabut kelapa menggunakan enzim selulase murni dari *Trichoderma reesei* terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel. Konsentrasi gula reduksi dari proses hidrolisis enzimatik dianalisis dengan metode DNS. Konsentrasi gula reduksi mengalami peningkatan pada jam ke 1 hingga jam ke 8, kemudian mengalami penurunan hingga jam ke 16. Pada jam ke 24 mengalami peningkatan, menurun pada jam ke 32 dan meningkat lagi pada jam ke 40. Peningkatan konsentrasi gula reduksi ini menunjukkan bahwa enzim selulase terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel dapat menghidrolisis sabut kelapa menjadi gula reduksi. Pada penelitian ini, aktivitas enzim selulase yang digunakan 15,339 U/mL dan hasil gula reduksi maksimum yang didapat 0,560 g/L.

Kata kunci: sabut kelapa, *chitosan*, nanopartikel, imobilisasi, gula reduksi

PREPARATION OF NANOPARTICLE CHITOSAN FOR ENZYME IMMOBILIZATION IN PURPOSE OF REDUCTION SUGAR PRODUCTION FROM COCONUT HUSK

Name : 1. Viktor Adrian (2313 100 022)
2. Raja Panal S. (2313 100 124)
Department : Chemical Engineering
Advisor : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng.

ABSTRACT

Coconut husk is containing lignocellulose so that it can be hydrolyzed into reducing sugars which are then fermented into ethanol and other chemicals such as alcohols, ethers, and carboxylic acids. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic sugar yield reduction is greater, high selectivity, require less energy, and environmentally friendly. But, the handicaps are the price of pure enzyme which is expensive and properties of enzymes that are difficult to separate. These can be solved by immobilizing the enzyme on a supporting material chitosan so that the enzyme can be used repeatedly. Chitosan was chosen because it is cheap, inert, hydrophilic, and supporting materials are biocompatible. But the problem of mass transfer arises because of coconut husk and chitosan both insoluble and separation between the immobilized enzyme and the substrate becomes difficult. To solve the problem of material support then the use of the mass transfer with nano size was needed. This study aims to learn about the preparation of chitosan nanoparticles as supporting materials in immobilized cellulase enzyme to produce reducing sugar from coconut husk waste with enzymatic hydrolysis. In this study nanoparticle chitosan were prepared using the ionotropic gelation method with sodium sulfate as gelation agent. From the analysis of TEM (Transmission Electron Microscopy) known that obtained nanoparticle chitosan had size between less than 20 nm

to more than 200 nm, with the most number of size was less than 20 nm. The nanoparticle chitosan mass obtained is strongly influenced by the volume of phosphate buffer every once washing. Then cellulase enzyme was immobilized with nanoparticle chitosan by using covalent method. The amount of immobilized cellulase enzyme on nanoparticle chitosan was analyzed by Bradford method of 66.5380%. Further enzymatic hydrolysis of coconut husk was done by using immobilized free cellulase enzyme from *Trichoderma reesei* on nanoparticle chitosan. The concentration of reducing sugar from the enzymatic hydrolysis process was analyzed by DNS method. The concentration of reducing sugar increased from 1 to 8 hours, then decreased to 16 hours. At 24 hours it increased, decreased at 32 hours and increased again at 40 hours. Increased concentration of reducing sugar showed that the immobilized cellulase enzyme on nanoparticle chitosan can hydrolyze coconut husk into reducing sugar. In this study, the used cellulase enzyme activity was 15,339 U/mL and result of maximum obtained reduction sugar was 0,560 g/L

Keywords: coconut husk, chitosan, nanoparticle, immobilization, reducing sugar

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat rahmat dan anugerah-Nya kami dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul :

“Pembuatan *Chitosan* Nanopartikel untuk Imobilisasi Enzim Dalam Rangka Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa”

Laporan skripsi merupakan salah satu persyaratan yang harus dilalui mahasiswa Teknik Kimia FTI-ITS guna memperoleh gelar sarjana.

Terselesainya skripsi ini tentunya tidak terlepas dari bantuan beberapa pihak yang berpengaruh selama proses pengerjaan laporan ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan kesempatan, kepintaran, kekuatan, kesehatan, kasih sayang, petunjuk, dan waktu yang cukup dalam penyelesaian Tugas Akhir ini
2. Orang tua dan keluarga atas segala dukungan dan doa yang diberikan.
3. Bapak Juwari, S.T., M.Eng, Ph.D selaku ketua Departemen Teknik Kimia FTI-ITS.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku kepala Laboratorium Teknologi Biokimia departemen Teknik Kimia FTI-ITS sekaligus selaku dosen pembimbing kami
5. Ibu Dr. Lailatul Qadariah, S.T., M.T., selaku Koordinator Program Studi S1 Teknik Kimia FTI-ITS
6. Bapak/Ibu dosen penguji.
7. Bapak dan Ibu Dosen pengajar dan seluruh karyawan Departemen Teknik Kimia FTI-ITS atas ilmu dan bantuan yang diberikan.

8. Mas Afan Hamzah, S.T. atas bimbingan, saran, dan motivasi yang diberikan selama penelitian skripsi ini.
9. Rekan-rekan di laboratorium Teknologi Biokimia serta angkatan K-53 atas segala saran, motivasi, serta ilmu yang tidak putus-putusnya kepada kami.
10. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dalam proses pengerjaan laporan skripsi ini.

Kami menyadari bahwa laporan skripsi yang telah kami buat masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran sangat kami harapkan. Akhir kata, kami berharap apa yang telah kami buat ini dapat bermanfaat bagi para pembacanya dan juga bagi kami sendiri.

Surabaya, Juli 2017

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Sabut Kelapa	5
II.2 Lignoselulosa	5
II.3 <i>Pretreatment</i>	8
II.3.1 <i>Pretreatment</i> Mekanik	8
II.3.2 <i>Pretreatment</i> Alkali	8
II.4 Enzim Selulase.....	9
II.5 Imobilisasi Enzim	11
II.5.1 Metode pengikatan pada penyangga (<i>Carrier binding</i>)	13
II.5.2 Metode pengikatan silang (<i>cross-linking</i>).....	15
II.5.3 Metode penjebakan (<i>entrapping</i>).....	15
II.6 <i>Chitosan</i>	16
II.7 <i>Chitosan</i> Nanopartikel	18
II.8 Hasil Penelitian Terdahulu.....	20
BAB III METODOLOGI PERCOBAAN	
III.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
III.2 Variabel Penelitian	23
III.3 Bahan dan Alat	23
III.3.1 Bahan Penelitian.....	23
III.3.2 Alat Penelitian	23

III.4 Tahapan Metode Penelitian	24
III.4.1 Pembuatan dan Pengukuran <i>Chitosan</i> Nanopartikel	24
III.4.1.1 Pembuatan <i>Chitosan</i> Nanopartikel (Biro, 2008)	24
III.4.1.2 Pengukuran <i>Chitosan</i> Nanopartikel	24
III.4.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase.....	25
III.4.2.1 Pembuatan Larutan DNS (Asam Dinitrosalisilat) (Widjaja, 2009)	25
III.4.2.2 Pembuatan Larutan CMC (<i>Carboxymethyl Cellulose</i>) (Widjaja, 2009).....	25
III.4.2.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa dengan CMC untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase (Widjaja, 2009)	25
III.4.2.4 Uji Aktivitas Larutan Enzim Selulase Sebelum Koreksi (Widjaja, 2009).....	26
III.4.2.5 Uji Aktivitas Larutan Enzim Selulase Koreksi (Widjaja, 2009).....	27
III.4.3 Uji Kadar Protein Enzim Selulase.....	27
III.4.3.1 Pembuatan <i>Dye Reagent</i>	27
III.4.3.2 Pembuatan Larutan Standar Protein (Bradford, 1976)	28
III.4.3.3 Pembuatan Kurva Standar Protein untuk Uji Kadar Protein Enzim Selulase	28
III.4.3.4 Uji Kadar Protein Enzim Selulase dengan Metode Bradford (Bradford, 1976).....	28
III.4.4 Imobilisasi Enzim Selulase dengan <i>Chitosan</i> Nanopartikel (El-Ghaffar, 2010)	28
III.4.5 Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi.....	29
III.4.5.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa Tanpa CMC untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi dan Hidrolisis	29
III.4.5.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi dengan Metode DNS (Anwar, 2011).....	29

III.4.6 Uji Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi dengan Metode Bradford (Bradford, 1976).....	30
III.4.7 <i>Pretreatment</i> Sabut Kelapa.....	30
III.4.7.1 <i>Pretreatment</i> Mekanik (Douglas, 1998) 30	
III.4.7.2 <i>Pretreatment</i> Kimia (NaOH 1% w/v) ...	30
III.4.8 Analisis Kadar Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin	31
III.4.9 Hidrolisis CMC	32
III.4.9.1 Prosedur Hidrolisis CMC dengan Enzim Selulase Terimobilisasi	32
III.4.9.2 Prosedur Hidrolisis CMC dengan Enzim Selulase Bebas	33
III.4.10 Hidrolisis Sabut Kelapa.....	34
III.4.10.1 Prosedur Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Selulase Terimobilisasi (Anwar, 2011)	34
III.4.10.2 Analisis Kadar Gula Reduksi Hasil Hidrolisis dengan Metode DNS (Anwar, 2011)	34
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Pembuatan dan Pengukuran <i>Chitosan</i> Nanopartikel ...	37
IV.1.1 Pembuatan <i>Chitosan</i> Nanopartikel (Biro, 2008) 37	
IV.1.2 Pengukuran <i>Chitosan</i> Nanopartikel.....	40
IV.2 Pengujian Aktivitas dan Kadar Protein Enzim Selulase	43
IV.2.1 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase	43
IV.2.2 Pengujian Kadar Protein Enzim Selulase	45
IV.3 Imobilisasi Enzim Selulase dengan <i>Chitosan</i> Nanopartikel	47
IV.4 Pengujian Aktivitas dan Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi.....	48
IV.4.1 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi	48
IV.4.2 Pengujian Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi.....	51
IV.5 <i>Pretreatment</i> Sabut Kelapa	53

IV.6 Hidrolisis	55
IV.6.1 Hidrolisis CMC	55
IV.6.2 Hidrolisis Sabut Kelapa.....	59
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan.....	63
V.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	xv
APPENDIKS	
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Sabut Kelapa	5
Gambar 2.2 Struktur Molekul Selulosa	6
Gambar 2.3 Struktur Molekul Hemiselulosa	7
Gambar 2.4 Struktur Molekul Lignin	8
Gambar 2.5 Skema Proses <i>Pretreatment</i> Alkali	9
Gambar 2.6 Proses Hidrolisis Selulosa oleh Enzim Selulase	11
Gambar 2.7 Metode Imobilisasi Enzim	12
Gambar 2.8 Imobilisasi Enzim dengan Teknik Carrier-Binding.	13
Gambar 2.9 Metode Imobilisasi Pengikatan Silang	15
Gambar 2.10 Metode Imobilisasi Penjebakan ke dalam Kisi dan Mikrokapsul	16
Gambar 2.11 Struktur Chitin (Kumar, 2000)	16
Gambar 2.12 Struktur Chitosan (Kumar, 2000)	17
Gambar 2.13 Penghilangan Gugus Asetil pada Gugus Asetamida (Kumar,2000)	17
Gambar 2.14 Kurva Distribusi Ukuran <i>Chitosan</i> Nanopartikel dengan Natrium Tripolifosfat sebagai <i>Gelation</i> <i>Agent</i> (Ukuran Rata-rata: 162 nm)	19
Gambar 3.1 Proses Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	26
Gambar 3.2 Rangkaian Alat Pretreatment NaOH 1%	31
Gambar 3.3 Rangkaian Alat Hidrolisis Sabut Kelapa	34
Gambar 4.1 Reaksi Pengikatan Silang Antara Gugus Amino yang Bermuatan Positif pada Chitosan dengan Anion Sulfat (Al-Remawi, 2012).....	38
Gambar 4.2 Chitosan Nanopartikel Dalam Bentuk Serbuk.....	40
Gambar 4.3 Hasil Analisis TEM	41
Gambar 4.4 Kurva Distribusi Chitosan Nanopartikel Berdasarkan Ukuran	42
Gambar 4.5 Kurva Standar Glukosa dengan CMC Untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase	44
Gambar 4.6 Kurva Standar Protein Untuk Menguji Kadar Protein dalam Enzim Selulase	46

Gambar 4.7 Mekanisme Reaksi Antara Enzim Selulase dan Chitosan Nanopartikel	48
Gambar 4.8 Kurva Standar Glukosa tanpa CMC Untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi	50
Gambar 4.9 Kurva Standar Glukosa tanpa CMC	57
Gambar 4.10 Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Selulase Terimobilisasi	60

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Perolehan Massa Rata-rata Chitosan Nanopartikel Sesudah Pengeringan pada Berbagai Volume Buffer Fosfat untuk Pencucian pada Centrifuge.....	39
Tabel 4.2 Distribusi Chitosan Nanopartikel Berdasarkan Ukuran	41
Tabel 4.3 Perhitungan Kurva Standar Glukosa dengan CMC Untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase	44
Tabel 4.4 Aktivitas Enzim Selulase.....	45
Tabel 4. 5 Perhitungan Kurva Standar Protein	46
Tabel 4.6 Kadar Protein dalam Enzim Selulase	47
Tabel 4.7 Perhitungan Kurva Standar Glukosa tanpa CMC Untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi	50
Tabel 4.9 Hasil Uji Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi dalam 0,1 gram <i>Chitosan</i>	52
Tabel 4.10 Persentase Komposisi Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah Pretreatment Kimia	55
Tabel 4. 11 Hasil Hidrolisis CMC Menggunakan Enzim Selulase Bebas dan Enzim Selulase Terimobilisasi	57

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Sabut kelapa yang terdiri dari 26.68% selulosa, 17.87% hemiselulosa, dan 41.2% lignin (Sangian et al, 2014), dapat dihidrolisis menjadi gula reduksi yang selanjutnya difermentasi menjadi bioetanol dan bahan kimia lain seperti alkohol, eter, dan asam karboksilat (Jorgensen et al, 2007). Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa dapat dilakukan secara kimia, fisika, dan biologis untuk menghasilkan gula reduksi. Hidrolisis secara kimia membutuhkan energi yang cukup besar, menghasilkan hasil samping, membutuhkan proses netralisasi, dan membutuhkan peralatan yang tahan korosi (Taherzadeh et al, 2008). Menurut Schacht et al (2008) hidrolisis secara fisika bersifat ramah lingkungan dan tidak memerlukan proses pemurnian tetapi membutuhkan energi yang cukup besar dan tidak ekonomis. Sedangkan hidrolisis secara biologis menggunakan enzim menghasilkan gula reduksi lebih besar, selektifitas lebih tinggi, membutuhkan lebih sedikit energi, dan ramah lingkungan (Yang et al, 2011). Akan tetapi metode hidrolisis secara enzimatik ini membutuhkan biaya yang mahal karena harga enzim murni yang mahal dan enzim merupakan protein yang larut dalam air sehingga dalam pemurnian produknya enzim ikut terbuang.

Salah satu cara mengurangi biaya pada hidrolisis enzimatik adalah dengan mengimobilisasi enzim tersebut pada material pendukung supaya enzim dapat digunakan kembali sehingga mengurangi biaya produksi (Cheng and Chang, 2013). Selain itu imobilisasi enzim juga memiliki beberapa kelebihan, yaitu adanya kemungkinan untuk digunakan pada proses yang kontinyu, penghentian reaksi secara cepat, mengontrol pembentukan produk, memudahkan untuk memisahkan enzim dari suatu campuran dan mampu beradaptasi terhadap berbagai macam desain kimia (Cao et al, 2013).

Berdasarkan penelitian El-Ghaffar et al (2010) yang melakukan imobilisasi enzim selulase pada material pendukung *chitosan*, *chitosan-l-glutamic acid* dan *chitosan-4-amino butyric acid* kombinasi metode *covalent attachment* dan *cross-linking* dengan menggunakan GDA menghasilkan kestabilan dan *retained activity* yang lebih tinggi. Akan tetapi, penelitian ini hanya menggunakan *carboxymethyl cellulose* (CMC), yaitu selulosa yang larut dalam air, belum digunakan bahan selulosa yang tidak larut dalam air seperti limbah padat lignoselulosa. *Chitosan* digunakan karena bersifat murah, inert, hidrofilik, dan material pendukung yang *biocompatible* sehingga cocok untuk imobilisasi. Adanya gugus amino memudahkan terjadinya ikatan kovalen *chitosan* dengan enzim

Pada penelitian ini digunakan substrat *insoluble* yaitu lignoselulosa pada sabut kelapa dan material pendukung yang *insoluble* juga yaitu *chitosan* sehingga hidrolisis enzimatis lignoselulosa *insoluble* dengan enzim terimobilisasi pada material pendukung *chitosan insoluble* memiliki kelemahan, yaitu menurunnya reaksi enzimatis yang terjadi karena meningkatnya *mass transfer resistance* (hambatan transfer massa) antara substrat dan enzim. Selain itu pemisahan antara substrat dan enzim terimobilisasi menjadi sulit (Liu, 2012).

Untuk mengatasi hal tersebut, penggunaan material pendukung dengan ukuran nano dapat mengatasi masalah hambatan transfer massa antara lignoselulosa dengan enzim terimobilisasi. Biro et al (2008) membuat *chitosan* nanopartikel menggunakan metode *ionotropic gelation* dengan dua *gelation agent* yang berbeda yaitu natrium tripolifosfat dan natrium sulfat. Ukuran rata-rata dari nanopartikel sangat dipengaruhi oleh *gelation agent* yang digunakan. Ukuran rata-rata partikel yang lebih kecil diperoleh dengan natrium tripolifosfat (162 nm) daripada dengan natrium sulfat (517 nm).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kajian tentang pembuatan *chitosan* nanopartikel sebagai material pendukung

pada enzim selulase terimobilisasi untuk menghasilkan gula reduksi dari limbah sabut kelapa dengan hidrolisis enzimatik.

I.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Pemanfaatan limbah pertanian berupa biomassa seperti sabut kelapa yang berpotensi sebagai bahan baku untuk menghasilkan gula reduksi.
2. Metode hidrolisis enzimatik yang digunakan untuk menghasilkan gula reduksi mempunyai kelemahan pada harga enzim yang mahal dan sifat enzim yang larut dalam air sehingga sulit dipisahkan. Untuk mengatasi kelemahan tersebut digunakan teknik imobilisasi enzim sehingga enzim bisa digunakan kembali.
3. Penggunaan material pendukung *chitosan* yang tidak larut dalam air (*insoluble matrix*) memiliki hambatan transfer massa yang besar dengan *insoluble* lignoselulosa. Penggunaan partikel yang lebih kecil (nanopartikel) diharapkan dapat mengatasi masalah ini.

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mempelajari pembuatan *chitosan* nanopartikel sebagai material pendukung pada enzim selulase terimobilisasi untuk menghasilkan gula reduksi dari limbah sabut kelapa dengan hidrolisis enzimatik.
2. Mengetahui pengaruh volume *buffer* fosfat tiap sekali pencucian terhadap massa *chitosan* nanopartikel yang dihasilkan.
3. Mengetahui jumlah protein enzim selulase yang terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel.
4. Melakukan konversi limbah sabut kelapa yang sangat melimpah menjadi gula reduksi dengan metode hidrolisis enzimatik.

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Sabut Kelapa

Buah kelapa terdiri 35% sabut kelapa (*exocarp*), 12% tempurung (*endocarp*), 28 % daging buah (*endosperm*), dan 25% air buah (Haryanto dan Suheryanto, 2004).

Sabut kelapa (*exocarp*) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1 terdiri dari kulit luar yang tahan air dan bagian berserat (*mesocarp*). Sabut kelapa merupakan salah satu biomassa yang mudah didapatkan dan merupakan hasil samping pertanian. Salah satu pemanfaatan sabut kelapa adalah sebagai bahan baku produksi glukosa melalui proses hidrolisis, karena mengandung bahan lignoselulosa. Kandungan dari sabut kelapa terdiri dari 26,68% selulosa, 17,87% hemiselulosa, dan 41,2% lignin (Sangian et al, 2014).



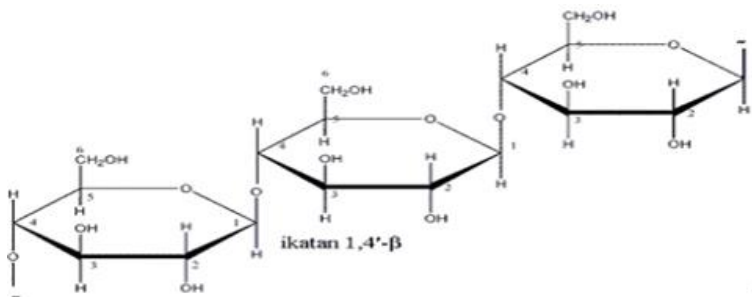
Gambar 2.1 Sabut Kelapa

II.2 Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tumbuhan dengan komponen utama selulosa, hemiselulosa dan lignin. Ketiganya membentuk suatu ikatan kimia yang kompleks yang menjadi bahan dasar penyusun dinding sel tumbuhan

(Hermiati et al, 2010). Lignoselulosa mengandung selulosa (35-50%), hemiselulosa (20-35%), dan lignin (10-25%). Kandungan selulosa dan hemiselulosa dalam lignoselulosa dapat digunakan untuk menghasilkan produk bermanfaat seperti gula, bioetanol, dan bahan kimia (alkohol, eter, asam karboksilat) (Jorgensen et al, 2007).

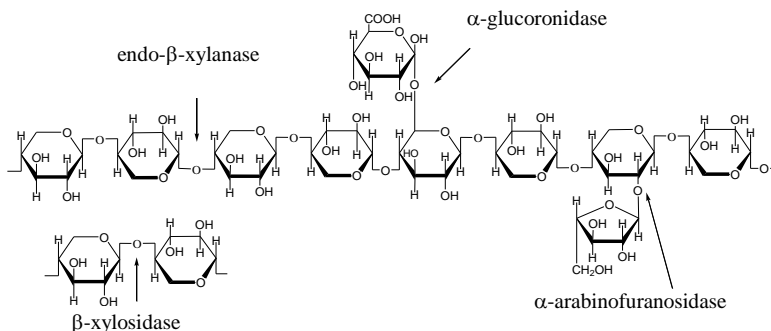
Selulosa merupakan komponen utama lignoselulosa adalah homopolisakarida yang tersusun atas unit-unit D-glukosa yang terhubung melalui ikatan β -1,4 glikosidik dengan derajat polimerisasi 10.000 – 14.000, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2. Struktur linier dari rantai selulosa menyebabkan selulosa bersifat kristalin, tidak mudah larut dan tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis (Jorgensen et al, 2007). Mikrofibril selulosa pada tempat-tempat tertentu memiliki struktur yang teratur (kristalin) dan pada tempat-tempat tertentu memiliki struktur yang kurang teratur (amorf) (Linder and Teeri, 1997).



Gambar 2.2 Struktur Molekul Selulosa

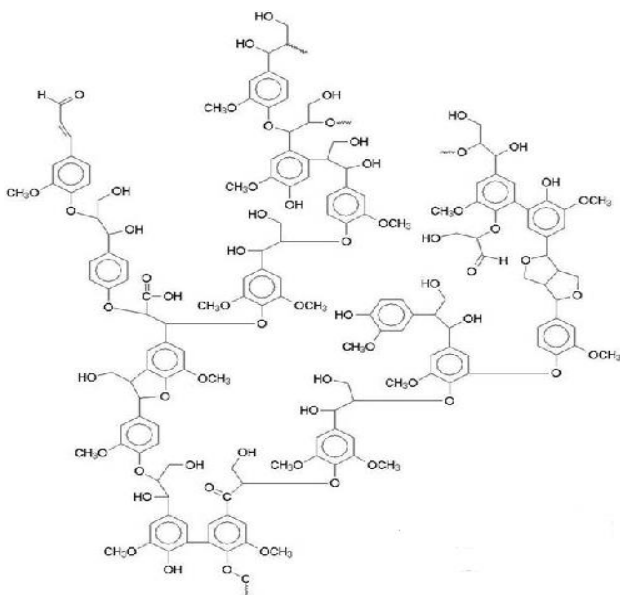
Hemiselulosa terdiri atas berbagai macam gula monomer, yaitu gula pentosa (xilosa, arabinosa) dan gula heksosa (glukosa, manosa, galaktosa). Hemiselulosa mempunyai rantai polimer yang pendek dan berbentuk amorf sehingga dapat larut dalam air. Oleh karena itu, hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam

menjadi monomer-monomernya (Ibrahim, 1998). Hemiselulosa merupakan molekul bercabang yang hanya memiliki 150 - 200 monomer. Rantai utama hemiselulosa dapat terdiri dari hanya satu jenis monomer (homopolimer) seperti xilan atau terdiri dari dua jenis atau lebih monomer (heteropolimer) seperti glukomanan, galaktomanan, dan arabinogalaktan (Mulcahy, 1996). Struktur dari hemiselulosa ditunjukkan dalam Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur Molekul Hemiselulosa

Lignin merupakan heteropolimer yang kompleks dengan berat molekul tinggi. Struktur molekul lignin berbeda bila dibandingkan polisakarida karena terdiri atas sistem aromatik yang terusun atas unit-unit fenilpropana yaitu p-kumaril alkohol, p-koniferil alkohol, dan p-sinapil alkohol seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.4. (Howard et al, 2003). Lignin berfungsi melindungi selulosa dan hemiselulosa dari reaksi kimiawi. Struktur lignin yang kompleks menyebabkan lignin sangat sulit didegradasi oleh mikroba ataupun bahan kimia, dibandingkan dengan selulosa atau hemiselulosa. Lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan bahan oksidator lain serta tahan terhadap proses hidrolisis oleh asam-asam mineral (Octavia, 2011).



Gambar 2.4 Struktur Molekul Lignin

II.3 Pretreatment

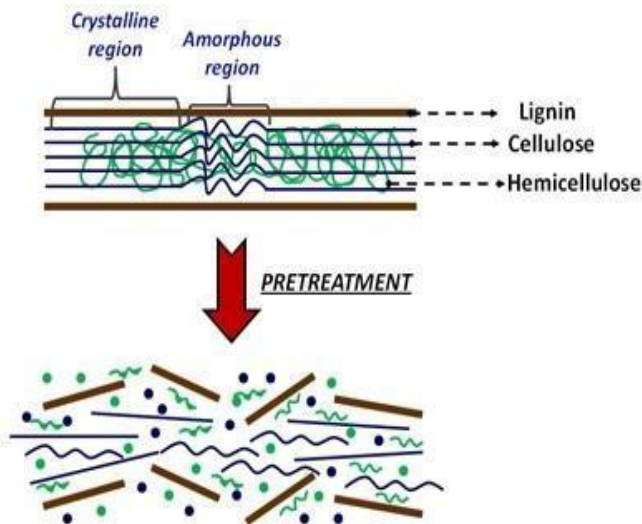
II.3.1 Pretreatment Mekanik

Pretreatment mekanik bertujuan mengurangi ukuran partikel bahan baku untuk meningkatkan aksesibilitas enzim ke bahan lignoselulosa. Keunggulan utama dari metode ini adalah ramah lingkungan karena tidak menggunakan bahan-bahan kimia dan tidak menghasilkan residu berbahaya (Hidayat, 2013).

II.3.2 Pretreatment Alkali

Pretreatment alkali bertujuan untuk memecah ikatan lignin (delignifikasi), mengurangi kandungan lignin, merusak struktur kristalin dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan (Prawitwong, 2012). Rusaknya struktur kristalin selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Selain itu,

hemiselulosa turut terurai menjadi senyawa gula sederhana: glukosa, galaktosa, manosa (heksosa), xilosa dan arabinosa (pentosa). *Pretreatment* alkali dalam pengolahan biomassa lignoselulosa umumnya menggunakan basa seperti NaOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, dan NH_4OH (Kumar et al, 2009). Gambar 2.5 menunjukkan skema proses *pretreatment* lignoselulosa. Adanya proses delignifikasi mampu memecah kompleks lignoselulosa yang terdiri atas lignin, selulosa dan hemiselulosa sehingga terdapat celah yang memungkinkan enzim untuk mengakses selulosa dan hemiselulosa pada proses hidrolisis (Mosier et al, 2005).



Gambar 2.5 Skema Proses Pretreatment Alkali

II.4 Enzim Selulase

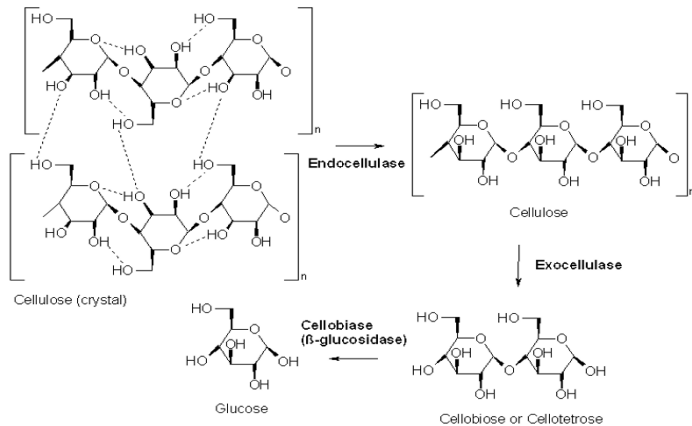
Enzim selulase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa,

selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa (Kulp, 1984) .

Hidrolisis enzimatik selulosa yang sempurna memerlukan aksi sinergis dari tiga tipe enzim ini, yaitu:

1. *Endo-1,4-β-D-glucanase* (endoselulase, *carboxymethylcellulase* atau *CMCase*) adalah glikoprotein dengan berat molekul 5300-145000. *Endo-1,4-β-D-glucanase* mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan internal α -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi. Enzim ini menyerang rantai bagian dalam dari selulosa amorphous yang menghasilkan selodektrin, selobiosa atau glukosa. Enzim ini tidak dapat menghidrolisa selulosa kristal secara sendirian, namun pada saat bersama dengan *Exo-β-1,4-glucanase*, enzim ini dapat mendegradasi selulosa kristal secara intensif (Ikram et al, 2005).
2. *Exo-1,4-β-D-glucanase (cellobiohydrolase)* merupakan glikoprotein dengan berat molekul 42000-65000. Terdapat dua jenis *Exo-1,4-β-D-glucanase* yaitu *Exo-1,4-β-cellobiohidrolase* dan *Exo-1,4-β-glucan glucohidrolase*. *Exo-1,4-β-D-glucanase* mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan/atau glukosa (Ikram et al, 2005).
3. *β-glucosidase (cellobiase)* adalah glikoprotein dengan berat molekul 50000-410000. Enzim ini dapat menghidrolisa selobiosa menjadi glukosa dan juga dapat mendegradasi seloligosakarida. Kerja enzim ini juga dihambat oleh produk reaksi yaitu glukosa (Ikram et al, 2005)

Proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Proses Hidrolisis Selulosa oleh Enzim Selulase

Selulase dapat diproduksi oleh fungi, bakteri, dan ruminansia. Produksi enzim secara komersial biasanya menggunakan fungi atau bakteri. Fungi yang bisa menghasilkan selulase antara lain genus *Trichoderma*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*. Sedangkan bakteri yang bisa menghasilkan selulase adalah *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga*. (Ikram et al, 2005)

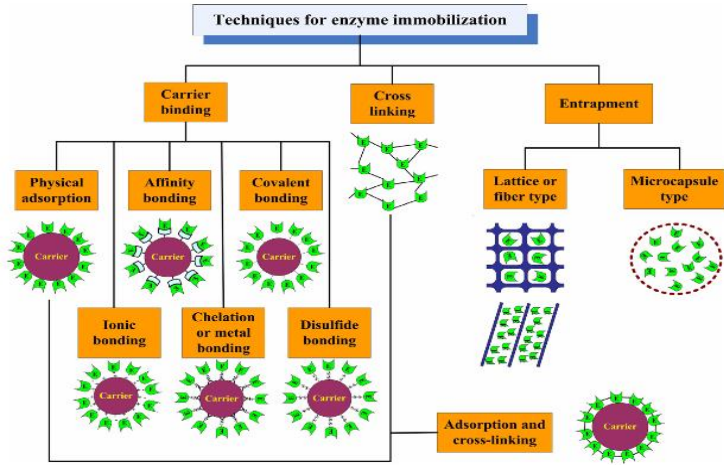
Enzim selulase yang dihasilkan oleh jamur *Trichoderma reesei* memiliki kandungan 60-80% *exo-1,4- β -D-glucanase*, 20-36% *endo-1,4- β -D-glucanase* dan 1% *1,4- β -D-glucosidases*. Sedangkan enzim selulase yang dihasilkan *Aspergillus niger* lebih banyak mengandung *β -glucosidase* (Ahamed and Vermette, 2008).

II.5 Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim adalah enzim yang secara fisik ditempatkan di dalam suatu daerah/ruang tertentu dengan tetap memiliki aktivitas katalitiknya serta dapat digunakan secara berulang-ulang dan terus menerus (Chibata, 1978). Enzim terimobilisasi adalah enzim yang diikat ke dalam bahan yang

sifatnya *inert* sehingga pergerakannya dalam ruang telah dibatasi seluruhnya atau hanya pada daerah tertentu saja. Tujuan utamanya adalah untuk menciptakan daya katalitik enzim yang berkesinambungan. Dalam imobilisasi enzim, pengikatan enzim pada suatu karier harus terjadi tanpa adanya kerusakan pada struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim tersebut, sehingga spesifitas substrat maupun gugus fungsi aktif tidak terganggu oleh proses ini. Aktivitas dan stabilitas enzim dipengaruhi oleh metoda imobilisasi, jenis enzim maupun jenis matrik yang digunakan (Muchtadi et al, 1992).

Selain enzim dapat digunakan kembali imobilisasi enzim juga memiliki beberapa kelebihan, yaitu adanya kemungkinan untuk digunakan pada proses yang kontinyu, pemberhentian reaksi secara cepat, mengontrol pembentukan produk, memudahkan untuk memisahkan enzim dari suatu campuran dan mampu beradaptasi terhadap berbagai macam desain kimia (Cao et al, 2013).

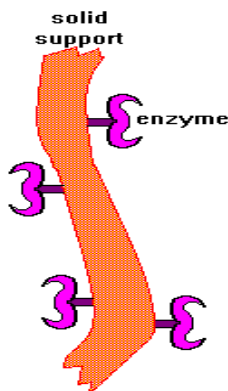


Gambar 2.7 Metode Imobilisasi Enzim

Metode imobilisasi ada tiga macam yaitu metode pengikatan pada penyangga (*carrier-binding*), metode pengikatan silang (*cross-linking*) dan metode penjebakan (*entrapping*) yang ditunjukkan pada Gambar 2.7 (Chibata, 1978).

II.5.1 Metode pengikatan pada penyangga (*Carrier binding*)

Pada metode *carrier-binding*, enzim akan dikat ke dalam suatu pembawa yang bersifat tidak larut di dalam air seperti ditunjukkan pada Gambar 2.8. Pada metode ini, jumlah enzim yang terikat pada pembawa dan aktivitas enzim setelah diimobilisasi bergantung pada sifat pembawanya. Pemilihan jenis pembawa akan bergantung pada karakteristik enzim seperti: ukuran partikel, luas permukaan, perbandingan gugus hidrofob dengan hidrofil, dan komposisi kimia enzim.



Gambar 2.8 Imobilisasi Enzim dengan Teknik Carrier-Binding

Metode *carrier-binding* dibagi menjadi tiga jenis, yaitu adsorpsi fisik, pengikatan secara ionik, dan pengikatan secara kovalen.

a. Adsorpsi Fisik

Metode ini dilakukan dengan cara melekatkan enzim pada permukaan penyangga yang tidak larut dalam air menggunakan ikatan yang lemah seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik atau gaya Van der Waals. Metode ini dapat dilakukan tanpa menyebabkan kehilangan aktivitas enzim yang besar, prosesnya termasuk yang paling mudah dan murah dibandingkan dengan metode lain. Namun karena lemahnya daya adhesi antara enzim dan penyangga maka enzim yang diimobilisasi dengan metode ini tidak cukup stabil untuk mencegah terjadinya desorpsi dari penyangga (Trevan, 1980). Adsorben yang umum digunakan termasuk berbagai bahan organik dan anorganik seperti alumina, selulosa, tanah liat, kaca, karbon, dan silika. (Smith, 1993).

b. Pengikatan secara ionik

Prinsip imobilisasi enzim dengan teknik ini adalah enzim akan terikat secara ionik pada pembawa yang mengandung residu penukar ion. Polisakarida dan polimer sintesis memiliki pusat penukar ion yang dapat digunakan sebagai pembawa. Pengikatan ionik antara enzim dengan pembawa mudah dilakukan jika dibandingkan dengan pengikatan enzim secara kovalen. Imobilisasi enzim dengan pengikatan ionik dapat mengakibatkan terjadinya sedikit perubahan konformasi dan sisi aktif enzim .

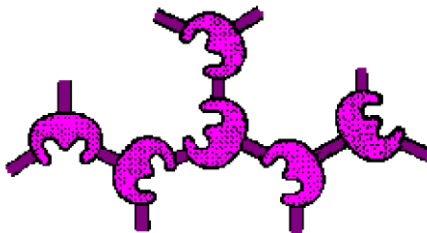
c. Pengikatan secara kovalen

Metode imobilisasi enzim dengan pengikatan secara kovalen didasarkan pada pengikatan enzim pada pembawa yang tidak larut dalam air melalui ikatan kovalen. Gugus fungsi yang sering terlibat dalam proses imobilisasi enzim dengan teknik ini adalah gugus amino, gugus hidroksil, gugus karboksil, sulfohidril dan gugus fenolik (Bintang, 2010). Pembawa yang digunakan antara lain gelas berpori dan keramik, polimer sintesis, selulosa, nilon, dan alumina. Pembentukan ikatan kovalen memiliki keuntungan karena ikatan kovalen tidak akan putus akibat adanya pengaruh pH, kekuatan ion atau substrat. Namun ada kemungkinan enzim menjadi tidak aktif sebagian atau seluruhnya

karena terjadinya reaksi kimia selama pembentukan ikatan kovalen tersebut (Smith, 1993)

II.5.2 Metode pengikatan silang (*cross-linking*)

Imobilisasi enzim dengan metode *cross-linking* dilakukan dengan pembentukan hubungan silang intermolekul antara molekul enzim dengan pereaksi bifungsional atau multifungsional sehingga menghasilkan jaringan protein tiga dimensi yang stabil dan tidak larut dalam air . Pereaksi bifungsional yang banyak digunakan untuk mengimobilisasi enzim adalah *glutaraldehyde* (Chibata, 1978). Pada metode *cross-linking* akan terjadi perubahan bentuk molekul enzim yang menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Maka dari itu metode *cross-linking* dikombinasikan dengan metode lain misalnya metode kovalen (El-Ghaffar, 2010). Metode imobilisasi enzim dengan teknik pengikatan silang ditunjukkan pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Metode Imobilisasi Pengikatan Silang

II.5.3 Metode penjebakan (*entrapping*)

Imobilisasi enzim dengan metode penjebakan didasarkan pada penempatan enzim di dalam kisi-kisi matriks polimer atau di dalam membran semi permeabel seperti mikrokapsul (Chibata 1978). Metode ini berbeda dengan metode imobilisasi dengan pengikatan secara kovalen maupun secara pengikatan silang, karena enzim tidak terikat pada kisi-kisi polimer atau membran. Terdapat dua jenis penjebakan enzim, yaitu penjebakan ke dalam kisi dan penjebakan ke dalam kapsul berukuran mikro seperti

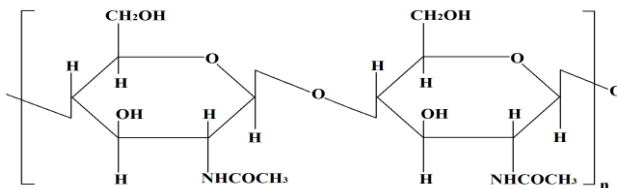
ditunjukkan pada Gambar 2.10. Penjebakan ke dalam kisi biasanya menggunakan polimer baik polimer alami (pati) ataupun polimer sintetis (poliakrilamid dan polivinilalkohol). Penjebakan ke dalam kapsul berukuran mikro melibatkan pemasukan enzim ke dalam membran polimer yang sifatnya semipermeabel.



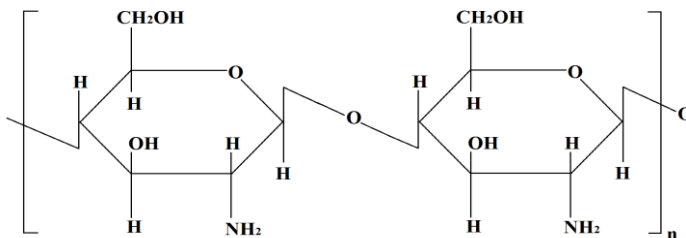
Gambar 2.10 Metode Imobilisasi Penjebakan ke dalam Kisi dan Mikrokapsul

II.6 Chitosan

Chitosan (2-amino-2-deoksi-D-glukopiranososa) adalah senyawa turunan dari *chitin* (N-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranososa) yang terdeasetilasi pada gugus nitrogennya. *Chitin* dan *chitosan* merupakan polimer linier (Kusumawati, 2009). *Chitin* umumnya diperoleh dari cangkang kepiting atau udang dan miselium jamur. Struktur *chitin* mirip dengan selulosa tetapi gugus hidroksil ($-OH$) pada atom karbon kedua dari selulosa digantikan oleh gugus asetamido (Kumar, 2000). Perbedaan struktur *chitin* dan *chitosan* ditunjukkan pada Gambar 2.11 dan 2.12.

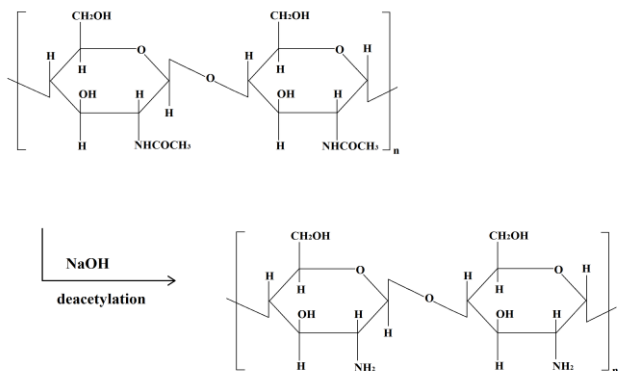


Gambar 2.11 Struktur *Chitin* (Kumar, 2000)



Gambar 2.12 Struktur *Chitosan* (Kumar, 2000)

Proses deasetilasi merupakan proses penghilangan gugus asetil dari rantai molekul *chitin*. Proses deasetilasi *chitin* dilakukan menggunakan larutan NaOH pekat, yang bertujuan untuk memutuskan ikatan kovalen antara gugus asetil dengan nitrogen pada gugus asetamida *chitin* sehingga berubah menjadi gugus amina ($-NH_2$) pada *chitosan*. Proses ini menghasilkan *chitosan* dengan gugus amina ($-NH_2$) yang memiliki derajat kereaktifan kimia tinggi. (Kim, 2004). Mekanisme penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida oleh suatu basa ditunjukkan pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Penghilangan Gugus Asetil pada Gugus Asetamida (Kumar,2000)

Proses deasetilasi yang terjadi pada *chitin* hampir tidak pernah sempurna sehingga dalam *chitosan* masih ada gugus asetil yang terikat pada beberapa gugus N. Derajat deasetilasi menunjukkan berkurangnya gugus asetil dari kitin menjadi gugus amino pada *chitosan*. Semakin tinggi derajat deasetilasi *chitosan*, maka gugus asetil yang terdapat dalam *chitosan* tersebut semakin sedikit. Derajat deasetilasi merupakan rasio unit 2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranosida dengan 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranosida. Rasio ini berperan dalam kelarutan dan sifat larutannya. Campuran dengan derajat deasetilasi di bawah 60% tidak larut dalam pelarut asam encer dan digolongkan sebagai *chitin*, sedangkan campuran dengan derajat deasetilasi di atas 60% dapat larut dalam asam encer digolongkan sebagai *chitosan* (Fouda, 2005).

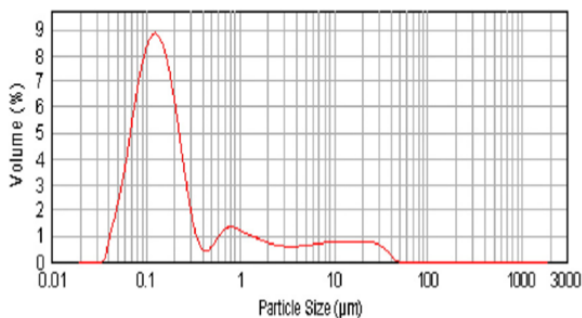
Proses kimia mengakibatkan terjadinya pemutusan rantai polimer secara acak. Hal ini menyebabkan berat molekul *chitosan* dapat terdistribusi luas dari ukuran kecil hingga yang berukuran besar. (Arsyamelati et al, 2015). *Chitosan* memiliki berat molekul yang tinggi dan bervariasi berdasarkan sumber materialnya dan metode preparasinya. *Chitin* memiliki berat molekul lebih besar dari 1 juta Dalton sedangkan berat molekul *chitosan* antara 100.000 – 1.200.000 Dalton, tergantung pada proses dan kualitas produk. *Chitosan* dapat larut pada kondisi sedikit asam (di bawah pH 6) dengan memprotonasi gugus amino bebas ($-NH_2$) menjadi amino kationik ($-NH_3^+$). Pelarut *chitosan* yang biasa digunakan adalah asam asetat dan asam format (Kim, 2004).

II.7 *Chitosan* Nanopartikel

Nanopartikel merupakan partikel koloid padat dengan diameter berkisar antara 1-1000 nm. Ada empat metode pembuatan *chitosan* nanopartikel yaitu: *ionotropic gelation*, *microemulsion*, *emulsification solvent diffusion* dan *polyelectrolyte complex*. Metode yang paling banyak digunakan adalah *ionotropic gelation* karena prosesnya sederhana dan mudah. Metode *ionotropic gelation* pertama kali diteliti oleh

Calvo et al (1997). Mekanisme pembentukan *chitosan* nanopartikel dengan metode *ionotropic gelation* berdasarkan pada interaksi elektrostatik antara muatan positif gugus amino pada *chitosan* dengan muatan negatif gugus pada polianion sehingga menyebabkan terjadinya ikatan silang (*crosslinking*) pada *chitosan*. Mula-mula *chitosan* dilarutkan dalam asam asetat dengan atau tanpa penambahan *stabilizing agent*, kemudian ditambahkan larutan polianion sambil diaduk. *Chitosan* nanopartikel secara spontan dibentuk akibat pengadukan mekanis pada suhu ruang (Tiyaboonchai, 2003).

Biro et al (2008) membuat *chitosan* nanopartikel menggunakan metode *ionotropic gelation* dengan dua *gelation agent* yang berbeda yaitu natrium tripolifosfat dan natrium sulfat . Ukuran rata-rata dari nanopartikel sangat dipengaruhi oleh *gelation agent* yang digunakan. Ukuran rata-rata partikel yang lebih kecil diperoleh dengan natrium tripolifosfat (162 nm) daripada dengan natrium sulfat (517 nm). Hal ini disebabkan nanopartikel yang dibuat dengan natrium sulfat mempunyai sifat berongga sehingga memiliki kemampuan mengembang yang lebih besar. Adapun pengukuran partikel dilakukan menggunakan difraksi laser dengan Malvern Mastersize 2000 *particle size analyzer* (Malvern Instrument Ltd., UK), di mana hasil distribusi ukurannya ditunjukkan pada Gambar 2.14.



Gambar 2.14 Kurva Distribusi Ukuran Chitosan Nanopartikel dengan NaTPP sebagai *Gelation Agent*

II.8 Hasil Penelitian Terdahulu

Hasil penelitian terdahulu yang mendasari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Biro et al. 2008. "Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization".

Membuat *chitosan* makropartikel dengan metode *precipitation*, mikropartikel dengan *emulsion cross-linking* dan nano partikel dengan *ionotropic gelation*. Kemudian melakukan imobilisasi β -galaktosidase dengan metode kovalen pada *chitosan* makro-, mikro- dan nano partikel. Imobilisasi pada *chitosan* nanopartikel yang dibuat dengan metode *ionotropic gelation* dengan sodium sulfat sebagai *gelation agent* memberikan aktivitas yang paling besar.

2. Al-Remawi, M.M.A. 2012. "Properties of Chitosan Nanoparticles Formed Using Sulfate Anions as Crosslinking Bridges".

Membuat dan mengkarakterisasi LMW *chitosan* nanopartikel dengan memvariasikan berat molekul *chitosan* terlebih dahulu menggunakan HCl (6, 13 dan 30 kDa). *Chitosan* nanopartikel dibuat dengan menggunakan anion sulfat dari natrium sulfat sebagai *crosslinking bridges*. Dihasilkan ukuran partikel bervariasi antara 100-500 nm.

3. El-Ghaffar et al. 2010. "Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization".

Melakukan imobilisasi selulase pada *chitosan*, *chitosan-l-glutamic acid* dan *chitosan-4-amino butyric acid* dengan metode kovalen dan kovalen+*cross linking*. Enzim terimobilisasi digunakan menghidrolisis *carboxymethyl cellulose* (CMC). Didapatkan kombinasi metode kovalen + *cross linking* menggunakan GDA menghasilkan kestabilan dan *retained activities* lebih tinggi.

4. Maziyah, N., Rahmah, L.N. 2016. “Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa Menggunakan *Crude* Enzim Terimobilisasi”.

Melakukan penelitian produksi gula reduksi dengan hidrolisis sabut kelapa hasil *pretreatment* alkali menggunakan *crude* enzim selulase terimobilisasi dari *Aspergillus niger*. Didapatkan hasil produksi gula reduksi tertinggi pada variabel hidrolisis menggunakan *crude* enzim selulase tanpa imobilisasi sebesar 0,012 gram dan *yield* 0,017 gram gula reduksi per gram hemiselulosa+selulosa, sedangkan hasil terendah ditunjukkan oleh variabel enzim *crude* selulase terimobilisasi *chitosan* dengan masa gula reduksi 0,003 gram dan *yield* 0,004 gram gula reduksi per gram hemiselulosa+selulosa.

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Biokimia, Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya pada bulan Februari 2017 – Juni 2017.

III.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Material pendukung:
 - 1.1 *Chitosan* nanopartikel
2. Enzim:
 - 2.1 Enzim selulase dari *Trichoderma reesei*
3. Substrat:
 - 3.1 *Carboxymethyl cellulose* (CMC)
 - 3.2 Sabut kelapa

III.3 Bahan dan Alat

III.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sabut kelapa, Asam dinitrosalisilat (Sigma-Aldrich, Germany), *Carboxymethyl cellulose* (Sigma-Aldrich, Germany), Glukosa (Merck), H_2SO_4 (Merck), Serum Bovine Albumin (Sigma-Aldrich, Switzerland), *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) (Sigma-Aldrich, Germany), Aquadest, Na_2SO_4 (Merck), NaOH (Merck), Na_2HPO_4 , $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, Tween 80, *Chitosan low molecular weight* (Sigma-Aldrich, Iceland)

III.3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Autoclave* (Astell Scientific, Inggris), *Hot plate & stirrer* (Snijders), *Spectrophotometer* (Cecil CE 1011, Inggris), *Analitical balance* (Ohaus, Cina), *Incubator* (Incucell carbolit,

Jerman), *Incubator shaker* (Incucell carbolit, Jerman), Kondensor refluks, Tabung reaksi, Gelas ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), Corong kaca, Pipet ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), Pipet tetes, *Beaker Glass* (Pyrex Iwaki, Indonesia), Labu Ukur 1000 mL (Pyrex Iwaki, Indonesia), Erlenmeyer (Pyrex Iwaki, Indonesia), Oven (VWR Scientific S/P 1350 G-2, Amerika), *Vortex* (VM-300, Taiwan), *Centrifuge* (Hermle Labortechnik, Jerman), Karet penghisap, Spatula, *Vacuum pump* (Weich), *oil bath*, Termometer, Rak kayu, Kuvet, Kertas Saring Whattman dan *Screener*.

III.4 Tahapan Metode Penelitian

III.4.1 Pembuatan dan Pengukuran *Chitosan* Nanopartikel

III.4.1.1 Pembuatan *Chitosan* Nanopartikel (Biro, 2008)

Chitosan nanopartikel dibuat dengan metode *ionotropic gelation*. Sebanyak 0,5 mL larutan Na_2SO_4 20% ditambahkan tetes demi tetes ke dalam 9,5 mL larutan *chitosan* 0,25% (dilarutkan dalam larutan asam asetat glasial 2% yang mengandung Tween 80 1%) selama sonikasi. Kemudian suspensi diaduk selama 2 jam dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan putar 500 rpm.

Selanjutnya partikel dikumpulkan dengan sentrifugasi (10.000 rpm, 10 menit, 20° C) dan dicuci dengan 0,02 mol / L penyangga (*buffer*) kalium fosfat (pH 7) hingga netral. *Chitosan* nanopartikel yang diperoleh disuspensikan dengan 10 mL larutan *buffer* setelah pencucian akhir. Selanjutnya suspensi dibekukan dalam *freezer*, lalu dikeringkan dengan *freeze dryer* dengan suhu -45°C dan tekanan 5 mTorr selama 24 jam. *Chitosan* nanopartikel yang telah dikeringkan kemudian disimpan di dalam lemari es pada suhu 4°C.

III.4.1.2 Pengukuran *Chitosan* Nanopartikel

Pengukuran *chitosan* nanopartikel dilakukan dengan metode analisis TEM (*Transmission Electron Microscopy*).

III.4.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase

III.4.2.1 Pembuatan Larutan DNS (Asam Dinitrosalisilat) (Widjaja, 2009)

NaOH sebanyak 16 gram dilarutkan dengan aquadest hingga volume 200 mL. Kemudian *sodium potassium tartrate* sebanyak 30 gram dan sodium metabisulfit sebanyak 8 gram dilarutkan dengan aquadest sampai volume 500 mL. 10 gram DNS dilarutkan menggunakan larutan NaOH sebanyak 200 mL. Kemudian larutan DNS ditambahkan ke dalam larutan *sodium potassium tartrate* dan sodium metabisulfit, setelah itu dilarutkan sempurna dengan aquadest hingga volume 1000 mL.

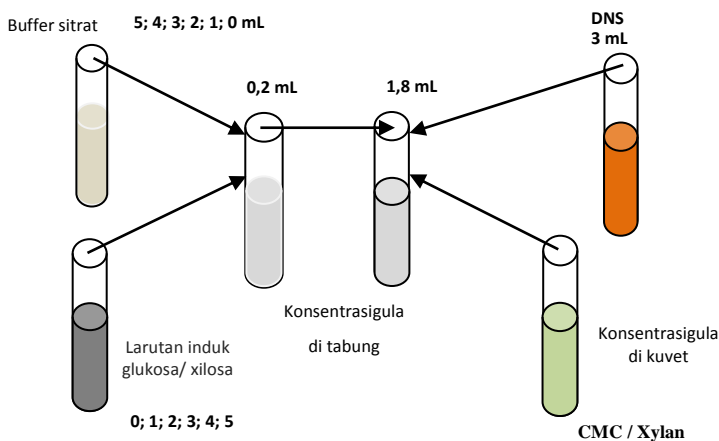
III.4.2.2 Pembuatan Larutan CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) (Widjaja, 2009)

Pembuatan larutan CMC langkah-langkahnya adalah, 2 gram CMC ditimbang kemudian dimasukkan ke erlemeyer. Setelah itu ditambahkan *buffer* sitrat dengan pH 5,5 sampai tepat 200 mL dan diaduk dengan stirrer selama 16 jam.

III.4.2.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa dengan CMC untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase (Widjaja, 2009)

Pada tahap pengujian ini langkah-langkah yang dilakukan adalah, pertama glukosa ditimbang 0,367 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan *buffer* sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sampai tepat 100 mL ke dalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL dan *buffer* sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL, 0 mL seperti ditunjukkan pada Gambar 3.1. Selanjutnya sebanyak 0,2 mL dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan ke dalam larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 mL CMC (*carboxymethyl cellulose*) ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit dan ditambahkan 3 mL DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung

reaksi. Selanjutnya campuran tersebut divorteks kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Terakhir membuat kurva kalibrasi dengan mengeplot konsentrasi glukosa di tabung terhadap absorbansi.



Gambar 3.1 Proses Pembuatan Kurva Standar Glukosa

III.4.2.4 Uji Aktivitas Larutan Enzim Selulase Sebelum Koreksi (Widjaja, 2009)

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim selulase dan 1,8 mL larutan CMC dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C . Kemudian ditambahkan 3 mL DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam larutan dan divorteks hingga tercampur rata. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan dalam air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya menggunakan 2 mL larutan CMC yang diperlakukan sama seperti sampel larutan enzim.

III.4.2.5 Uji Aktivitas Larutan Enzim Selulase Koreksi (Widjaja, 2009)

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim selulase dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C. Kemudian ditambahkan 3 mL DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam larutan dan divorteks hingga tercampur rata. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit, kemudian ditambahkan 1,8 mL larutan CMC. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan kembali dalam air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan dalam air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya menggunakan 2 mL larutan CMC yang diperlakukan sama seperti sampel larutan enzim. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan cara menghitung selisih absorbansi larutan enzim sebelum koreksi dan larutan enzim koreksi, kemudian nilainya dikalikan dengan slope kurva standar glukosa.

III.4.3 Uji Kadar Protein Enzim Selulase

III.4.3.1 Pembuatan Dye Reagent

Untuk membuat *dye reagent* larutkan 100 mg *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 di dalam 50 mL etanol 95%, kemudian tambahkan 100 mL asam fosfat 85%. Campuran dihomogenkan sehingga warna biru yang disebabkan CBB berangsur-angsur menghilang. Selanjutnya larutkan dengan aquadest hingga 1 L dan saring larutan dengan kertas saring sebelum digunakan. Reagen Bradford setelah disaring berwarna cokelat cerah. Apabila belum berwarna cokelat cerah, proses filtrasi harus dilakukan kembali.

III.4.3.2 Pembuatan Larutan Standar Protein (Bradford, 1976)

Larutan standar protein dibuat dengan menimbang 0,1 gram *bovine serum albumin* (BSA) yang dilarutkan dengan 100 mL aquadest steril untuk mendapatkan larutan BSA dengan konsentrasi 1 mg/mL. Kemudian membuat larutan NaCl 0,15 M dengan cara melarutkan 5,844 gram NaCl dengan 666 mL aquadest steril.

III.4.3.3 Pembuatan Kurva Standar Protein untuk Uji Kadar Protein Enzim Selulase

Kurva standar protein dibuat dengan mengplot konsentrasi protein terhadap absorbansinya. Larutan standar BSA-NaCl sebanyak 0,1 mL dengan berbagai konsentrasi ditambahkan dengan 5 mL *dye reagent*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm.

III.4.3.4 Uji Kadar Protein Enzim Selulase dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

Pengujian kadar protein dilakukan dengan melarutkan 0,05 mL enzim selulase dengan 0,05 mL NaCl. Larutan kemudian divorteks agar homogen. Selanjutnya ditambahkan 5 mL *dye reagent* ke dalam larutan tersebut dan larutan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm.

III.4.4 Imobilisasi Enzim Selulase dengan *Chitosan* Nanopartikel (El-Ghaffar, 2010)

Sebanyak 0,1 gram *chitosan* nanopartikel ditambahkan ke dalam enzim selulase yang telah diukur aktivitas dan kadar proteinnya. Proses imobilisasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 25°C dan kecepatan pengadukan 125 rpm. Campuran kemudian disentrifugasi dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan dengan cara dicuci sebanyak 2 kali dengan larutan *buffer* fosfat pH 7

masing-masing \pm 20 mL. Enzim selulase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C.

III.4.5 Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi

III.4.5.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa Tanpa CMC untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi dan Hidrolisis

Pada tahap pengujian ini langkah-langkah yang dilakukan adalah, pertama glukosa ditimbang 0,367 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan *buffer* sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sampai tepat 100 mL kedalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL dan *buffer* sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL, 0 mL. Selanjutnya sebanyak 0,2 mL dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan ke dalam larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 mL aquadest ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 3 mL DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut divorteks kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Terakhir membuat kurva kalibrasi dengan mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

III.4.5.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi dengan Metode DNS (Anwar, 2011)

Sebanyak 0,1 gram enzim selulase terimobilisasi ditambahkan 2 mL CMC ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi dalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dengan kecepatan 125 rpm. Kemudian diambil 1 mL dan dimasukkan di *microtube*, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 mL dan ditambahkan

1,8 mL aquadest ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 mL larutan DNS dan divorteks agar tercampur merata. Selanjutnya dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan air es selama 10 menit. Kemudian setelah suhu larutan normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar glukosa enzim selulase terimobilisasi dilakukan dengan mengalikan absorbansi dengan slope kurva standar glukosa tanpa CMC..

III.4.6 Uji Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

Pengujian kadar protein enzim selulase terimobilisasi dilakukan dengan melarutkan 0,05 mL *supernatant* enzim selulase terimobilisasi dengan 0,05 mL NaCl. Larutan kemudian divorteks agar homogen. Selanjutnya menambahkan 5 mL *dye reagent* ke dalam larutan tersebut dan menginkubasi larutan selama 10 menit. Setelah itu absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya dilakukan penghitungan kadar protein melalui absorbansi yang didapatkan dari spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

III.4.7 Pretreatment Sabut Kelapa

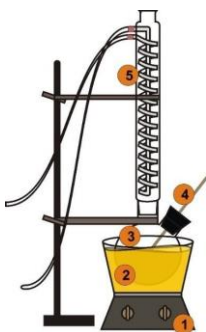
III.4.7.1 Pretreatment Mekanik (Douglas, 1998)

Sabut kelapa sebagai bahan baku yang diperoleh dari limbah, dikeringkan di bawah sinar matahari selama 3 hari. Kemudian sampel tersebut digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Selanjutnya sampel yang sudah berupa butiran-butiran dimasukkan ke dalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C dan diayak dengan menggunakan *screener* berukuran 100-120 mesh.

III.4.7.2 Pretreatment Kimia (NaOH 1% w/v)

Sebanyak 25 gram sabut kelapa yang telah mengalami perlakuan *pretreatment* mekanik, dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan pula NaOH

1% w/v sebanyak 500 mL. Campuran diaduk dengan pengaduk stirer dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 16 jam. Setelah 16 jam, campuran didinginkan dan disaring, padatan dicuci dengan aquadest panas sampai pH 7. Selanjutnya, padatan yang sudah netral (pH 7) dioven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kemudian, padatan didinginkan dan digiling kembali kemudian disimpan. Padatan sabut kelapa ini dioven kembali pada suhu 60°C selama 24 jam sebelum digunakan pada proses selanjutnya. Gambar rangkaian alat saat proses *pretreatment* NaOH 1%, ditampilkan dalam Gambar 3.2.



Keterangan:

1. Hotplate Stirrer
2. *Oil bath*
3. Labu Leher 2
4. Termometer
5. Kondensor Reflux

Gambar 3.2 Rangkaian Alat Pretreatment NaOH 1%

III.4.8 Analisis Kadar Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin (Datta and Rathin, 1981).

Sebanyak 1 gram sampel (berat a) yang akan dianalisis kadar selulosa, hemiselulosa dan ligninnya dimasukkan ke dalam labu alas bulat 250 mL, kemudian ditambahkan 150 mL H₂O ke dalam labu tersebut. Campuran direfluks pada suhu 100 °C dengan penangas air selama 1 jam, kemudian hasilnya disaring dengan kertas saring, residu yang diperoleh dicuci dengan air panas sebanyak 300 mL untuk menghilangkan sisa-sisa ekstrak yang tidak ikut terbuang. Padatan yang diperoleh dikeringkan

dalam oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan. Berat padatan ini disebut (berat b).

Selanjutnya, padatan b dimasukkan kembali ke dalam labu alas bulat 250 mL kemudian ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks dengan penangas air selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci sampai pH netral dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan dengan oven pada suhu 60°C. Berat padatan ini disebut (berat c).

Tahap selanjutnya, padatan c dimasukkan kembali kedalam labu alas bulat 250 mL kemudian ditambahkan 10 mL H₂SO₄ 72% dan dibiarkan pada suhu kamar selama 4 jam, kemudian ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks dengan penangas air selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci sampai pH netral dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan dengan oven pada suhu 60°C. Berat padatan ini disebut (berat d). Kemudian padatan d diabukan dan ditimbang beratnya, berat padatan ini disebut (berat e). Cara mengetahui kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin dengan metode ini adalah, dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\begin{aligned} \left[\frac{c - d}{a} \right] \times 100\% &= \text{Kadar Selulosa} \\ \left[\frac{b - c}{a} \right] \times 100\% &= \text{Kadar Hemiselulosa} \\ \left[\frac{d - e}{a} \right] \times 100\% &= \text{Kadar Lignin} \end{aligned}$$

III.4.9 Hidrolisis CMC

III.4.9.1 Prosedur Hidrolisis CMC dengan Enzim Selulase Terimobilisasi

Enzim selulase yang telah terimobilisasi dengan *chitosan* nanopartikel diambil sebanyak 0,1 gram dan ditambahkan 2 mL CMC ke dalam botol sampel kemudian dimasukkan ke dalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dan kecepatan 125

rpm. Sampel sebanyak 1 mL diambil dengan menggunakan pipet volume lalu dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian ditimbang dengan neraca analitis sehingga memiliki masa gabungan (*microtube* + larutan + tutup) yang sama antara tube 1 dengan tube 2 pada *centrifuge* nantinya. Karena proses sentrifugasi dilakukan dengan *centrifuge* kecil maka ketelitian penimbangannya adalah 0,01 gram. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C. Proses sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan padatan (solid) dengan larutan (*supernatant*) pada hidrolisat. Setelah itu sebanyak 0,2 mL larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan pipet volume kemudian ditambahkan 1,8 mL aquadest dan 3 mL DNS. Selanjutnya campuran tersebut divorteks agar tercampur rata kemudian dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit dan didinginkan dalam air es (4°C) selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar gula reduksi dilakukan dengan mengalikan absorbansi dengan slope kurva standar glukosa tanpa CMC.

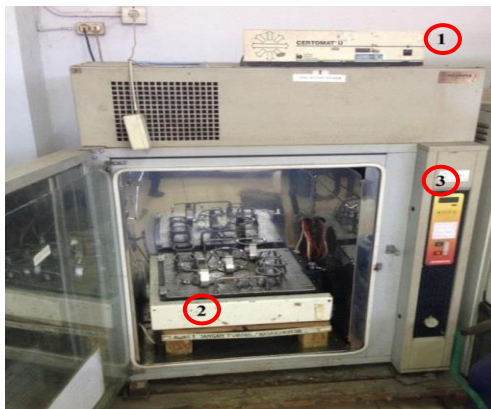
III.4.9.2 Prosedur Hidrolisis CMC dengan Enzim Selulase Bebas

Untuk hidrolisis CMC menggunakan enzim selulase bebas, sebanyak 3,995 mg (1,7 ml) enzim selulase dan 2 ml CMC dimasukkan ke dalam botol sampel kemudian dimasukkan ke dalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dan kecepatan 125 rpm. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar gula reduksi dilakukan dengan mengalikan absorbansi dengan slope kurva standar glukosa tanpa CMC.

III.4.10 Hidrolisis Sabut Kelapa

III.4.10.1 Prosedur Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Selulase Terimobilisasi (Anwar, 2011)

Pada tahap hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa langkah-langkahnya adalah, 1 gram sabut kelapa (100 mesh) yang sudah dilakukan *pretreatment* secara kimia (delignifikasi) dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Kemudian ditambahkan enzim selulase hasil imobilisasi yang sudah diketahui aktivitasnya ke dalam sabut kelapa. Selanjutnya ditambahkan *buffer* fosfat 0,02 M pH 7 ke dalam larutan enzim dan sabut kelapa sampai 20 mL. Proses hidrolisis dilakukan dengan *incubator shaker* dengan kecepatan *shaker* 125 rpm suhu dijaga konstan 60°C selama 24 jam. Peralatan untuk proses hidrolisis ditunjukkan oleh Gambar 3.3. Selanjutnya hasil hidrolisis dianalisis kadar glukosanya dengan menggunakan metode DNS.



Pembaca dan
Pengatur Suhu

Keterangan
Gambar:

1. Pengatur RPM
2. Shaker
3. Pembaca Suhu dan Pengatur Suhu

Gambar 3.3 Rangkaian Alat Hidrolisis Sabut Kelapa

III.4.10.2 Analisis Kadar Gula Reduksi Hasil Hidrolisis dengan Metode DNS (Anwar, 2011)

Sampel yang telah dihidrolisis diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian disentrifugasi selama

10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 mL dan ditambahkan 1,8 mL aquadest ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 mL larutan DNS dan divorteks agar tercampur merata. Selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dalam air es selama 10 menit. Kemudian setelah suhu larutan normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuat *chitosan* nanopartikel sebagai material pendukung pada enzim selulase terimobilisasi untuk menghasilkan gula reduksi dari limbah sabut kelapa dengan hidrolisis enzimatik. Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan hasil akhir gula reduksi, terdapat beberapa proses yang harus dilakukan:

1. Pembuatan dan pengukuran *chitosan* nanopartikel
2. Imobilisasi enzim selulase dengan *chitosan* nanopartikel
3. *Pretreatment* sabut kelapa yang terdiri atas *pretreatment* mekanik dan kimia
4. Hidrolisis *carboxymethyl cellulose* (CMC) dan sabut kelapa dengan enzim selulase terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel.

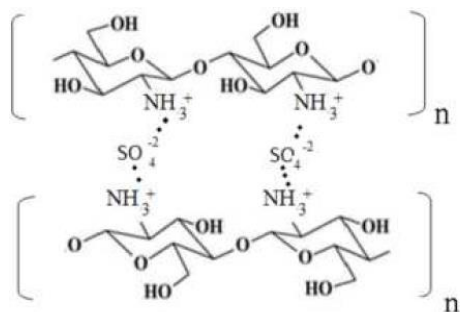
IV.1 Pembuatan dan Pengukuran *Chitosan* Nanopartikel

IV.1.1 Pembuatan *Chitosan* Nanopartikel (Biro, 2008)

Chitosan nanopartikel dibuat dengan metode *ionotropic gelation*. Mula-mula dibuat larutan *chitosan* 0,25% dengan cara melarutkan *chitosan* dalam larutan asam asetat glasial 2% yang mengandung Tween 80 1% kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 24 jam. Asam asetat glasial 2% berfungsi untuk melarutkan *chitosan* dengan cara memprotonasi gugus amino bebas ($-NH_2$) menjadi amino kationik ($-NH_3^+$) (Kim, 2004). Sedangkan Tween 80 sebagai surfaktan yang berfungsi untuk menstabilkan emulsi partikel dalam larutan dengan cara mencegah timbulnya penggumpalan (aglomerasi) antar partikel (Nadia, 2014). Kemudian larutan Na_2SO_4 20% dibuat dengan cara melarutkan Na_2SO_4 anhidrat dalam aquadest.

Chitosan nanopartikel dibuat dengan menuangkan 9,5 mL larutan *chitosan* 0,25% ke dalam beaker gelas 50 mL lalu dimasukkan dalam sonikator. Sebanyak 0,5 mL larutan Na_2SO_4 20% ditambahkan tetes demi tetes ke dalam larutan *chitosan*

tersebut dan disonikasi selama 10 menit. Mekanisme pembentukan *chitosan* nanopartikel dengan metode *ionotropic gelation* berdasarkan pada interaksi elektrostatis antara muatan positif gugus amino ($-\text{NH}_3^+$) pada *chitosan* dengan muatan negatif gugus sulfat ($-\text{SO}_4^{2-}$) pada natrium sulfat sehingga menyebabkan terjadinya ikatan silang (*crosslinking*) pada *chitosan*. *Chitosan* nanopartikel terbentuk karena adanya ikatan kovalen antara gugus amino dan sulfat. *Chitosan* nanopartikel secara spontan dibentuk akibat pengadukan mekanis pada suhu ruang (Tiyaboonchai, 2003). Sonikasi bertujuan untuk memecah molekul-molekul yang berukuran besar menjadi bagian-bagian lebih kecil dengan gelombang ultrasonik (Wahyono et al, 2010). Reaksi pengikatan silang antara gugus amino yang bermuatan positif pada *chitosan* dengan anion sulfat dapat dilihat pada gambar 4.1 (Al-Remawi, 2012).



Gambar 4.1 Reaksi Pengikatan Silang Antara Gugus Amino yang Bermuatan Positif pada Chitosan dengan Anion Sulfat (Al-Remawi, 2012)

Kemudian suspensi *chitosan* nanopartikel yang diperoleh diaduk selama 2 jam dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan putar 500 rpm. Proses pengadukan ini bertujuan supaya proses ikatan silang berlangsung sempurna dan homogen (Nadia, 2014). Selanjutnya *chitosan* nanopartikel dikumpulkan dengan sentrifugasi (10.000 rpm, 10 menit, 20° C) dan dicuci dengan 0,02

mol / L penyangga (*buffer*) kalium fosfat (pH 7) hingga netral. Pencucian dilakukan dengan membandingkan hasil pencucian antara 10 mL, 20 mL, 30 mL dan 40 mL *buffer* fosfat. *Chitosan* nanopartikel yang sudah netral disuspensikan dengan 10 mL larutan *buffer* setelah pencucian akhir. Suspensi tersebut dikeringkan dengan dua metode, yakni dengan menggunakan oven dan *freeze dryer*. Untuk metode pengeringan menggunakan oven, suspensi dikeringkan dengan suhu 60 °C hingga beratnya konstan. Sedangkan untuk pengeringan dengan menggunakan *freeze dryer*, suspensi terlebih dahulu dibekukan dalam *freezer*, lalu dikeringkan dengan *freeze dryer* dengan suhu -45°C dan tekanan antara 5 hingga 10 mTorr selama 24 jam. Perbandingan hasil *chitosan* nanopartikel kering yang diperoleh dapat ditinjau pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Perolehan Massa Rata-rata Chitosan Nanopartikel Sesudah Pengeringan pada Berbagai Volume Buffer Fosfat untuk Pencucian pada Centrifuge

Volume Buffer Tiap Satu Kali Pencucian	Frekuensi Pencucian	Sarana Pengeringan	
		Oven	<i>Freeze Dryer</i>
10 mL	4 kali	0.0092 gram	0.0174 gram
20 mL	2 kali	0.0164 gram	0.0397 gram
30 mL	2 kali	0.0116 gram	0.0286 gram
40 mL	1-2 kali	0.0105 gram	0.0314 gram

Ditinjau dari massa rata-rata yang diperoleh, pencucian dengan 20 mL *buffer* fosfat memberikan hasil terbaik. Adanya perbedaan perolehan massa rata-rata disebabkan karena pengaruh frekuensi pencucian dengan sentrifugasi, di mana pencucian dengan volume *buffer* fosfat yang berbeda akan menyebabkan frekuensi pencucian yang berbeda pula. Semakin sering pencucian dilakukan semakin sedikit *chitosan* nanopartikel yang diperoleh. Namun semakin banyak volume buffer pencuci yang

digunakan dalam satu kali pencucian, sentrifugasi yang terjadi semakin tidak efektif dikarenakan kecilnya partikel *chitosan* nano.

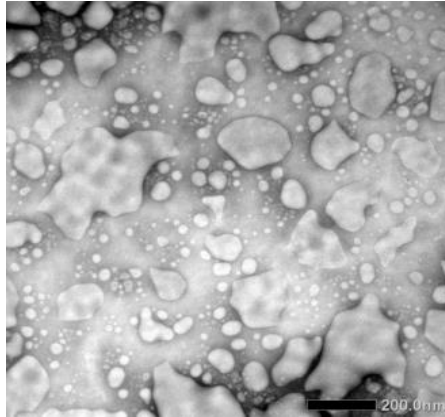
Metode pengeringan dengan oven mengakibatkan *chitosan* nanopartikel menempel pada wadah sehingga sulit diambil dan digunakan kembali, sedangkan dengan *freeze dryer*, pengeringan dilakukan dengan tekanan vakum sehingga *chitosan* nanopartikel kering yang diperoleh lebih mudah diambil. *Chitosan* nanopartikel dalam bentuk serbuk dapat dilihat pada Gambar 4.3. *Chitosan* nanopartikel yang telah dikeringkan kemudian disimpan di dalam lemari es pada suhu 4°C.



Gambar 4.2 Chitosan Nanopartikel Dalam Bentuk Serbuk

IV.1.2 Pengukuran *Chitosan* Nanopartikel

Pengukuran *chitosan* nanopartikel dilakukan dengan metode analisis *Transmission Electron Microscopy* (TEM - JEOL JEM 1400) di Departemen Kimia FMIPA UGM.

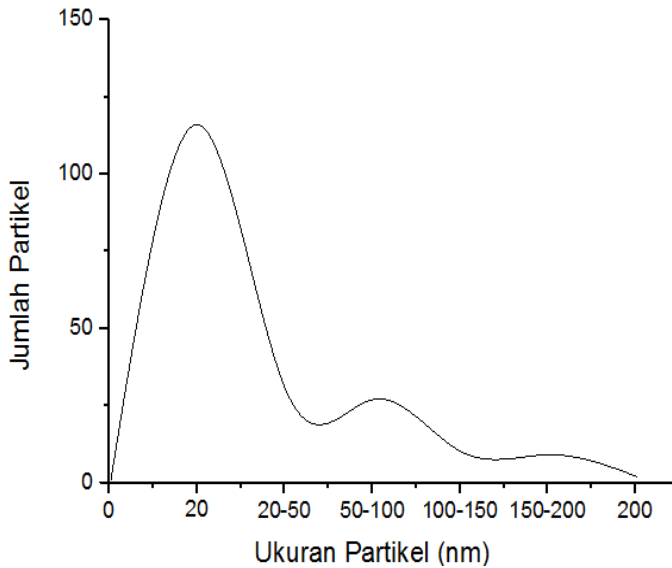


Gambar 4.3 Hasil Analisis TEM

Dari gambar diatas dapat dibuat tabel distribusi jumlah *chitosan* nanopartikel sesuai dengan ukuran. Distribusi jumlah *chitosan* nanopartikel sesuai dengan ukuran dapat dilihat pada tabel 4.2. terlihat juga bahwa mayoritas partikel yang diperoleh berbentuk bulat. Namun partikel tidak terdispersi sempurna, ditinjau dari masih banyaknya partikel yang berukuran cukup besar dan berbentuk tidak beraturan. Untuk material pendukung, partikel berdimensi kecil bersifat konduktif untuk mengimobilisasi enzim lebih banyak karena luas permukaan yang lebih besar.

Tabel 4.2 Distribusi Chitosan Nanopartikel Berdasarkan Ukuran

Range Ukuran Partikel	Jumlah Partikel	%
≤ 20	116	59.7938
20-50	30	15.4639
50-100	27	13.9175
100-150	10	5.15464
150-200	9	4.63918
≥ 200	2	1.03093
Total	194	100



Gambar 4.4 Kurva Distribusi Chitosan Nanopartikel Berdasarkan Ukuran

Dari hasil analisis TEM yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa *chitosan* nanopartikel yang diperoleh berukuran antara kurang dari 20 nm hingga lebih dari 200 nm, di mana jumlah terbanyak adalah *chitosan* nanopartikel dengan ukuran kurang dari 20 nm. Hasil yang diperoleh lebih baik dibandingkan dengan penelitian Biro et al. (2008) yang menghasilkan *chitosan* nanopartikel berukuran 517 nm. Adanya gumpalan *chitosan* juga menunjukkan bahwa terjadi agregasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Biro et al. (2008) yang menyebutkan bahwa meskipun percobaan dilakukan dengan sangat hati-hati, agregasi tetap tidak dapat dihindari.

IV.2 Pengujian Aktivitas dan Kadar Protein Enzim Selulase

IV.2.1 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase

Sebelum proses pengujian ini perlu dilakukan pembuatan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dapat dibuat dengan cara melarutkan 0,367 gram glukosa dalam 100 mL *buffer* sitrat pH 5,5 di dalam labu ukur. Kemudian mengencerkan larutan induk glukosa dengan larutan *buffer* sitrat 0,1 M pH 5,5. Pengenceran larutan glukosa ini dilakukan di dalam tabung reaksi dengan berbagai konsentrasi yaitu (0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1, 5:0). Dimana diambil larutan glukosa sebanyak 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL dan ditambahkan *buffer* sitrat pH 5,5 secara berurutan sebanyak 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL, 0 mL. Dari setiap tabung reaksi diambil sebanyak 0,2 mL sehingga didapatkan 6 tabung reaksi baru dengan konsentrasi yang berbeda. Sebanyak 0,2 mL glukosa tadi ditambahkan dengan 1,8 mL CMC. Lalu diinkubasi di dalam inkubator selama 10 menit pada suhu 35 °C dan ditambahkan 3 mL DNS.

Selanjutnya campuran tersebut divorteks kemudian dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit dan didinginkan dalam air es (4°C) selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Dari absorbansi yang didapatkan kemudian dibuat kurva kalibrasi antara konsentrasi glukosa dan absorbansi. Kurva kalibrasi ini digunakan untuk menguji keaktifan enzim selulase.

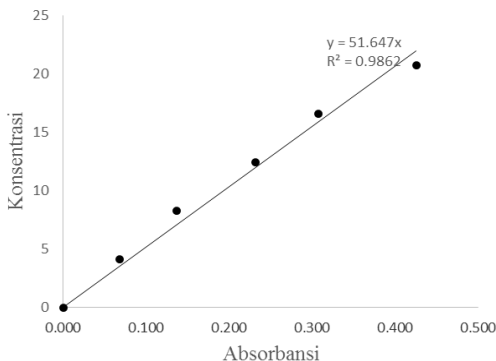
Kurva standar glukosa diperoleh dari larutan glukosa yang ditambahkan dengan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC). CMC digunakan karena dapat dihidrolisis oleh enzim selulase dan menghasilkan glukosa. Dari glukosa yang dihasilkan dapat diuji aktivitas enzimnya. Pengujian dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 540 nm. Pada panjang gelombang ini, reaksi gula reduksi dengan reagen DNS akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan. Warna ini yang akan terbaca absorbansinya (Miller, 1959).

Tabel 4.3 Perhitungan Kurva Standar Glukosa dengan CMC
Untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase

Larutan Glukosa 0,024 M (mL)	Buffer (mL)	Konsentrasi $\mu\text{mol/mL}$		Absorbansi
		Di tabung	Di kuvet	
0	5	0	0	0.000
1	4	4.15	0.166	0.068
2	3	8.3	0.332	0.137
3	2	12.45	0.498	0.232
4	1	16.6	0.664	0.308
5	0	20.75	0.83	0.426

Konsentrasi glukosa awal sebesar 20,75 $\mu\text{mol/mL}$

Dari tabel 4.3 dapat dibuat kurva standar glukosa dengan cara mengplot data konsentrasi glukosa dalam tabung sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Selanjutnya ditarik regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan linier. Berikut adalah grafik kurva standar glukosa dengan CMC dari percobaan ini.



Gambar 4.5 Kurva Standar Glukosa dengan CMC Untuk Uji
Aktivitas Enzim Selulase

Dari kurva pada Gambar 4.5 diketahui persamaan regresi linier $y = 51,647x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol/mL}$) dan x sebagai absorbansi. Yang berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol/mL}$) yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim. Dari kurva standar glukosa yang sudah didapat langkah selanjutnya adalah menguji aktivitas enzim. Aktivitas enzim ini diuji dengan metode DNS. Pengukuran aktivitas dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

Tabel 4.4 Aktivitas Enzim Selulase

Enzim	Absorbansi (A)	Konsentrasi ($\mu\text{mol/mL}$)	Aktivitas (U/mL)
Selulase	0,601	30,679	15,339

Keterangan

- A1 : Absorbansi larutan sebelum koreksi
A2 : Absorbansi larutan koreksi
(A1-A2) : Absorbansi larutan setelah koreksi

IV.2.2 Pengujian Kadar Protein Enzim Selulase

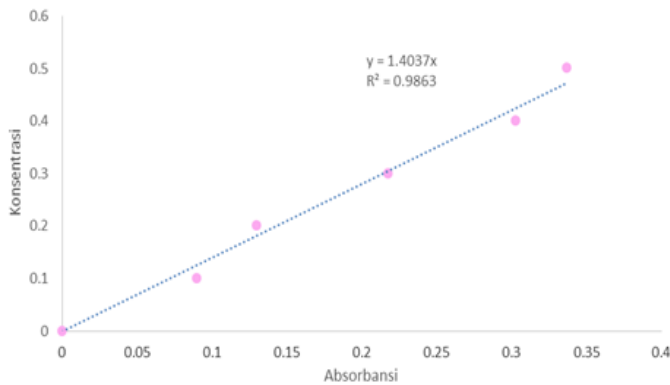
Selain pengujian aktivitas enzim selulase, dilakukan pula uji Bradford untuk mengetahui kadar protein dari enzim selulase. Pengujian kadar protein ini diawali dengan persiapan pembuatan *dye reagent* dan larutan standar protein yaitu larutan bovine serum albumin (BSA) 1 mg/mL dan larutan NaCl 0,15 M. Setelah proses persiapan selesai dilakukan pembuatan kurva standar protein. Kurva standar dibuat dengan mengeplot konsentrasi protein terhadap absorbansinya. Larutan standar BSA-NaCl sebanyak 0,1 mL dengan berbagai konsentrasi ditambahkan dengan 5 mL *dye reagent* dan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm. Pengujian kadar protein dilakukan dengan melarutkan 0.05 mL enzim selulase dengan 0.05 mL NaCl.

Larutan kemudian divorteks agar homogen. Selanjutnya menambahkan 5 mL *dye reagent* ke dalam larutan tersebut dan menginkubasi larutan selama 10 menit. Setelah itu absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595 nm.

Tabel 4.5 Perhitungan Kurva Standar Protein

Volume BSA (mL)	Volume NaCl (mL)	Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi
0	0.1	0	0
0.01	0.09	0.1	0.09
0.02	0.08	0.2	0.13
0.03	0.07	0.3	0.218
0.04	0.06	0.4	0.303
0.05	0.05	0.5	0.337

Dari Tabel 4.5 dapat dibuat kurva standar protein dengan cara mengeplot data konsentrasi BSA (mg/mL) sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Selanjutnya ditarik regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan linier. Berikut adalah grafik kurva standar protein dari percobaan ini.



Gambar 4.6 Kurva Standar Protein Untuk Menguji Kadar Protein dalam Enzim Selulase

Dari kurva pada Gambar 4.6 diketahui persamaan regresi linier $y = 1,4037x$ dengan y sebagai konsentrasi protein (BSA) dalam mg/mL dan x sebagai absorbansi yang berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi kadar protein. Selanjutnya dilakukan penghitungan kadar protein melalui absorbansi yang didapatkan dari spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Data hasil uji Bradford dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Kadar Protein dalam Enzim Selulase

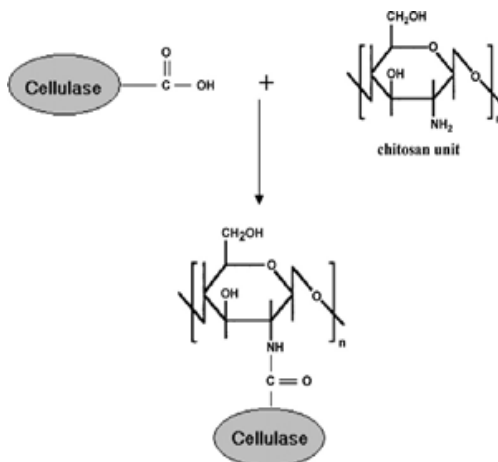
Enzim	Absorbansi	Slope	Konsentrasi (mg/mL)
Enzim Selulase	0,123	1,4037	3,454

Selain mengukur aktivitas enzim, pengukuran kadar protein adalah hal yang sangat penting dilakukan untuk mengetahui kualitas enzim. Enzim merupakan protein dimana aktivitas katalitiknya bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein. Asam-asam amino yang menyusun enzim sangat mempengaruhi aktivitas katalitiknya sebagai enzim (Lehninger, 1993).

IV.3 Imobilisasi Enzim Selulase dengan *Chitosan* Nanopartikel

Imobilisasi enzim selulase dengan *chitosan* nanopartikel dilakukan dengan menimbang 0,1 gram *chitosan* nanopartikel kemudian ditambahkan ke dalam enzim selulase yang sudah diuji aktivitas dan kadar proteinnya. Enzim selulase dan *chitosan* nanopartikel diletakkan di dalam erlenmeyer 50 mL kemudian dimasukkan ke dalam *incubator shaker* selama 24 jam pada suhu 25°C dan kecepatan pengadukan 125 rpm. Campuran kemudian disentrifugasi dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan dari *chitosan* nanopartikel yang sudah terimobilisasi dengan cara dicuci sebanyak 2 kali dengan larutan *buffer* fosfat pH 7 masing-masing +/- 20 mL. Enzim selulase yang telah diimobilisasi

kemudian disimpan pada suhu 4°C. Mekanisme reaksi antara enzim selulase dan *chitosan* nanopartikel dapat dilihat pada gambar 4.7 (El-Ghaffar, 2010)



Gambar 4.7 Mekanisme Reaksi Antara Enzim Selulase dan Chitosan Nanopartikel (El-Ghaffar, 2010)

IV.4 Pengujian Aktivitas dan Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi

Untuk menguji keberhasilan dari imobilisasi enzim selulase menggunakan *chitosan* nanopartikel, dilakukan pengujian aktivitas dan kadar protein enzim selulase setelah proses imobilisasi. Dari hasil pengujian didapatkan perbandingan hasil aktivitas dan kadar protein enzim selulase sebelum dan sesudah dilakukan imobilisasi.

IV.4.1 Pengujian Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi

Enzim selulase yang telah terimobilisasi dengan *chitosan* nanopartikel kemudian diambil *supernatant*-nya dan dilakukan

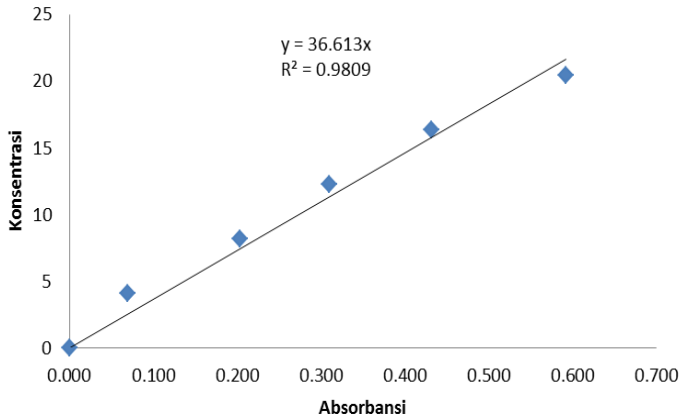
pengujian aktivitas enzim selulase terimobilisasi dengan metode DNS.

Sebelum melakukan uji aktivitas enzim selulase terimobilisasi, tahapan awal yang dilakukan adalah mempersiapkan kurva standar glukosa tanpa CMC yang nantinya akan digunakan untuk perhitungan konsentrasi glukosa hasil imobilisasi dan hidrolisis. Prosedur pembuatan kurva standar tanpa CMC ini sama seperti prosedur pembuatan kurva standar glukosa untuk mengukur keaktifan enzim, akan tetapi tidak menggunakan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC), melainkan menggunakan aquadest. Hal ini dikarenakan konsentrasi yang ingin diukur adalah konsentrasi gula reduksi saja bukan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan oleh enzim (aktivitas enzim).

Tabel 4.7 Perhitungan Kurva Standar Glukosa tanpa CMC Untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi

Larutan Glukosa 0,024 M (mL)	Buffer (mL)	Konsentrasi Glukosa Di tabung ($\mu\text{mol/mL}$)	Absorbansi
0	5	0	0
1	4	4,082	0,069
2	3	8,164	0,204
3	2	12,247	0,310
4	1	16,329	0,432
5	0	20,411	0,592

Dari Tabel 4.7 dapat dibuat kurva standar glukosa tanpa CMC dengan cara mengplot data konsentrasi glukosa dalam tabung ($\mu\text{mol/mL}$) sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Selanjutnya ditarik regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan garis linier. Berikut ini adalah grafik kurva standar glukosa tanpa CMC.



Gambar 4.8 Kurva Standar Glukosa tanpa CMC Untuk Uji Aktivitas Enzim Selulase Terimobilisasi

Dari Gambar 4.8 didapatkan persamaan $y = 36,613x$, dimana y adalah konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol/mL}$) dan x adalah absorbansi, selanjutnya persamaan ini digunakan untuk menghitung konsentrasi glukosa yang terbentuk setelah imobilisasi dan pada proses hidrolisis.

Enzim selulase yang telah terimobilisasi dengan *chitosan* nanopartikel diambil sebanyak 0,1 gram dan ditambahkan 2 mL CMC ke dalam botol sampel kemudian dimasukkan ke dalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dan kecepatan 125 rpm. Sampel sebanyak 1 mL diambil dengan menggunakan pipet volume lalu dimasukan ke dalam *microtube* kemudian ditimbang dengan neraca analitis sehingga memiliki masa gabungan (*microtube* + larutan + tutup) yang sama antara tube 1 dengan tube 2 pada *centrifuge* nantinya. Karena proses sentrifugasi dilakukan dengan *centrifuge* kecil maka ketelitian penimbangannya adalah 0,01 gram. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C . Proses sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan endapan dengan larutan (*supernatant*). Setelah itu sebanyak 0,2

mL larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan pipet volume kemudian ditambahkan 1,8 mL aquadest dan 3 mL DNS. Selanjutnya campuran tersebut divorteks agar tercampur rata kemudian dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit dan didinginkan dalam air es (4°C) selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar glukosa enzim selulase dilakukan dengan mengalikan absorbansi larutan (*supernatant*) dengan slope kurva standar glukosa.

Dari hasil pengujian didapatkan perbandingan hasil antara aktivitas enzim selulase sebelum dilakukan imobilisasi dan *supernatant* enzim selulase setelah dilakukan imobilisasi. Aktivitas total enzim bebas sebesar 76,695 unit sedangkan aktivitas *supernatant* enzim selulase yang sudah diimobilisasi dengan *chitosan* nanopartikel sebesar 2,014 unit.

Berkurangnya nilai aktivitas enzim selulase diduga karena terjadinya faktor pembagian (*partitioning*). Penambahan matriks *chitosan* membuat enzim mengalami pembagian (*portioning*) dan mengurangi aktivitas awalnya. Klibanov (1983) dalam Said, Muljono (1989) menyatakan bahwa enzim terimobilisasi umumnya mempunyai aktivitas yang lebih rendah dibanding dengan enzim bebasnya. Terdapat beberapa hambatan yang terjadi jika enzim berada dalam bentuk imobil. Hambatan yang menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas pada enzim imobil antara lain, pengaruh pembagian (*partitioning*), pengaruh hambatan difusi dan pengaruh hambatan sterik.

IV.4.2 Pengujian Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi

Selain itu juga dilakukan pengujian kadar protein terhadap *supernatant* dari enzim selulase setelah dilakukan imobilisasi menggunakan metode Bradford. Enzim selulase yang ditambahkan dibuat 6, 9, 12, 15 mg protein. Hal ini dilakukan

untuk menentukan penambahan enzim selulase yang terbaik. Pengujian kadar protein dilakukan dengan melarutkan 0,05 mL *supernatant* enzim selulase terimobilisasi dengan 0,05 mL NaCl. Larutan kemudian divorteks agar homogen. Selanjutnya menambahkan 5 mL *dye reagent* ke dalam larutan tersebut dan menginkubasi larutan selama 10 menit. Setelah itu mengukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm.

Pengujian kadar protein ini dilakukan untuk menunjukkan adanya protein yang terabsorpsi oleh *chitosan* nanopartikel. Data kadar protein ini dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Tabel 4.8 Hasil Uji Kadar Protein Enzim Selulase Terimobilisasi dalam 0,1 gram *Chitosan*

Total Protein ditambahkan (mg)	Protein sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	Persen Terimobilisasi (%)
6	2,0077	3,9923	66,5380
9	4,5827	4,4173	49,0816
12	5,3554	6,6446	55,3715
15	7,0537	7,9463	52,9754

Dari Tabel 4.9 dapat dilihat bahwa hasil imobilisasi dengan persentase terimobilisasi paling baik adalah dengan penambahan 6 mg protein dengan enzim terimobilisasi sebanyak 3,9923 mg protein atau sebesar 66,5380%. Hal ini menunjukkan penambahan enzim 6 mg protein untuk imobilisasi merupakan yang paling efisien. Total protein yang terabsorpsi menunjukkan bahwa *chitosan* nanopartikel mampu mengabsorpsi protein dari enzim selulase. Hal ini menunjukkan bahwa enzim selulase dapat terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel. Protein dalam enzim selulase hanya terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel sebesar 66,5380%. Jumlah enzim terimobilisasi sangat dipengaruhi dengan ketersediaan gugus amina dan karboksil pada *support* (El-Ghaffar, 2010).

IV.5 Pretreatment Sabut Kelapa

Proses *pretreatment* dari sabut kelapa terdiri atas *pretreatment* mekanik dan kimia. Proses *pretreatment* mekanik bertujuan untuk memperluas permukaan sabut kelapa sehingga dapat mempermudah pada proses selanjutnya yakni proses *pretreatment* kimia dan proses hidrolisis. Sedangkan proses *pretreatment* kimia bertujuan untuk memperkecil jumlah lignin yang terkandung didalam selulosa sehingga nantinya selulosa dan hemiselulosa dapat dengan mudah didegradasi

Pada proses *pretreatment* mekanik sabut kelapa dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Kemudian sampel tersebut digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Sampel yang sudah berupa butiran-butiran dimasukkan kedalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Setelah dioven, sabut kelapa diayak untuk memperoleh ukuran 100 mesh, hal ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga memudahkan mendegradasi selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa. (Anwar et al., 2011).

Setelah *pretreatment* mekanik dilanjutkan dengan *pretreatment* kimia. Proses *pretreatment* kimia ini bertujuan untuk mengurangi jumlah lignin yang terkandung pada lignoselulosa dengan menggunakan basa. Lignoselulosa yang mengandung kadar lignin tinggi akan menghasilkan gula reduksi yang lebih kecil karena lignin bersifat kokoh dan melindungi selulosa dan hemiselulosa dari hidrolisis. Dengan mengurangi jumlah lignin pada lignoselulosa maka selulosa dan hemiselulosa akan lebih mudah diakses menyebabkan lebih mudahnya proses hidrolisis yang dilakukan dan jumlah gula reduksi yang dihasilkan lebih besar.

Pada proses *pretreatment* kimia, tahapan yang dilakukan adalah menimbang 25 gram sabut kelapa yang sebelumnya telah mengalami *pretreatment* mekanik. Kemudian memasukan 25 gram sabut kelapa tersebut ke dalam labu leher 3 dan menambahkan NaOH 1% sebanyak 500 mL. Campuran kemudian dipanaskan dan direfluks pada suhu 80°C selama 16 jam.

Setelah proses *pretreatment* selesai, campuran kemudian didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Campuran sabut kelapa dan NaOH ini kemudian dipisahkan dengan cara disaring, dan sisa-sisa NaOH dicuci dengan *aquadest* steril hingga pH 7. Selanjutnya, padatan yang telah netral dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kemudian, padatan didinginkan dan digiling kembali sebelum disimpan.

Ikatan silang dari struktur aromatik lignin mampu memperlambat penetrasi yang dilakukan oleh enzim. Larutan NaOH pada *pretreatment* kimia dapat menyerang dan merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf serta memisahkan sebagian hemiselulosa (Gunam and Antara, 1999). Ion OH⁻ dari NaOH memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin, sedangkan ion Na⁺ akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat. Lignin yang terlarut ditandai dengan adanya warna hitam yang disebut lindi hitam (*black liqour*). Digunakan NaOH 1% (%w/w) karena apabila digunakan NaOH dengan kadar yang lebih besar, hal ini mengakibatkan selulosa dan hemiselulosa banyak yang terlarut bersama dengan lignin, sehingga akan mempengaruhi hasil akhir dalam kadar glukosa yang ingin dicapai (Widjaja, 2013).

Sabut kelapa sebelum dan sesudah *pretreatment* dilakukan analisis untuk mendapatkan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin (Datta and Rathin, 1981). Pada analisis ini, digunakan asam sulfat 1N dan asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N. Asam sulfat 1 N digunakan untuk melarutkan hemiselulosa sedangkan campuran asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N dapat melarutkan selulosa. Padatan kemudian diabukan untuk mendapatkan kadar lignin. Proses analisis diawali dengan mereflux 1 gram sampel dengan H₂O selama 1 jam pada suhu 100°C, padatan dikeringkan dan dioven selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan mereflux sampel dengan asam sulfat 1 N selama 1 jam pada suhu 100°C. Pada proses ini, asam sulfat 1 N akan melarutkan hemiselulosa yang terdapat pada sampel sehingga berat sampel yang telah kehilangan kadar hemiselulosa

dapat dihitung. Selanjutnya, sampel yang telah melalui *treatment* asam sulfat 1 N direflux kembali dengan campuran asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N. Campuran asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N ini akan melarutkan selulosa dalam sampel sehingga berat sampel yang telah kehilangan selulosa dapat dihitung. Selanjutnya sampel diabukan, tujuannya adalah untuk menghilangkan kadar lignin dalam sampel sehingga berat lignin yang terkandung dalam sampel dapat dihitung. Data komposisi selulosa, hemiselulosa, dan lignin dari sabut kelapa sebelum dan sesudah *pretreatment* kimia ditunjukkan pada Tabel 4.10.

Tabel 4.9 Persentase Komposisi Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah Pretreatment Kimia

Variabel	Komposisi (% berat)		
	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
Sebelum <i>Pretreatment</i>	22,35	18,99	43,11
Setelah <i>Pretreatment</i>	23,55	22,67	33,56

Pada Tabel 4.10 dapat terlihat bahwa kadar lignin mengalami penurunan setelah dilakukan *pretreatment* kimia. Hal ini menunjukkan bahwa basa (NaOH) mampu mendegradasi lignin sehingga dapat mempermudah proses hidrolisis enzimatik untuk menghasilkan gula reduksi.

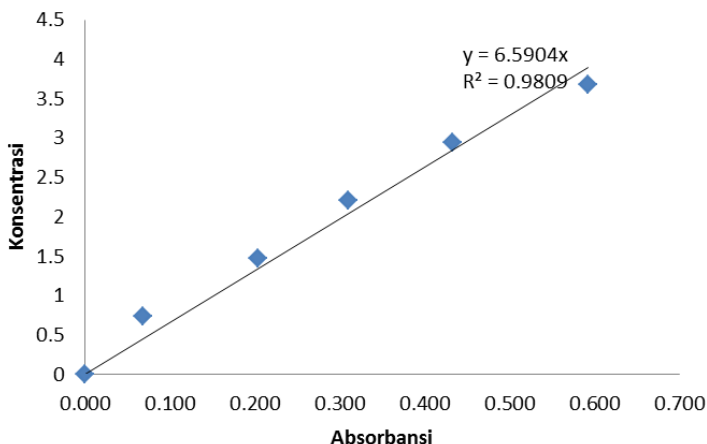
IV.6 Hidrolisis

IV.6.1 Hidrolisis CMC

Enzim selulase yang telah terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel ditambahkan 3 ml *buffer* dan ditambahkan 2 mL CMC ke dalam botol sampel kemudian dimasukkan ke dalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dan kecepatan 125 rpm. Pemisahan enzim terimobilisasi dari larutan gulanya dilakukan dengan dua cara. Pertama dengan cara sentrifugasi dimana sampel sebanyak 1 mL diambil dengan menggunakan pipet volume lalu dimasukkan ke dalam tabung *centrifuge*

kemudian ditimbang dengan neraca analitis sehingga memiliki masa gabungan (tabung *centrifuge* + larutan + tutup) yang sama antara tabung 1 dengan tabung 2 pada *centrifuge* nantinya dengan ketelitian penimbangannya adalah 0,1 gram. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C. Proses sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan antara padatan (*chitosan* yang mengandung enzim selulase) dengan larutan (*supernatant*). Sementara untuk cara kedua sampel dibiarkan selama 4-5 jam sampai *chitosan* nanopartikel yang mengandung enzim selulase mengendap ke bawah. Setelah itu sebanyak 0,2 mL larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan pipet volume kemudian ditambahkan 1,8 mL aquadest dan 3 mL DNS. Selanjutnya campuran tersebut divorteks agar tercampur rata kemudian dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit dan didinginkan dalam air es (4°C) selama 10 menit. Setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar gula reduksi dilakukan dengan mengalikan absorbansi dengan slope kurva standar glukosa tanpa CMC.

Untuk hidrolisis CMC menggunakan enzim bebas, sebanyak 3,553 mg protein enzim selulase (1,1156 ml enzim selulase) dan 2 ml CMC dimasukkan ke dalam botol sampel kemudian dimasukkan ke dalam *incubator shaker* selama 1 jam pada suhu 35°C dan kecepatan 125 rpm. Setelah itu sebanyak 0,2 mL larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan pipet volume kemudian ditambahkan 1,8 mL aquadest dan 3 mL DNS. Selanjutnya campuran tersebut divorteks agar tercampur rata kemudian dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit dan didinginkan dalam air es (4°C) selama 10 menit. Setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar gula reduksi dilakukan dengan mengalikan absorbansi dengan slope kurva standar glukosa tanpa CMC.



Gambar 4. 9 Kurva Standar Glukosa tanpa CMC untuk Hidrolisis

Dari Gambar 4.9 didapatkan persamaan $y = 6,5904x$, dimana y adalah konsentrasi gula reduksi (g/L) dan x adalah absorbansi, selanjutnya persamaan ini digunakan untuk menghitung konsentrasi gula reduksi yang terbentuk setelah proses hidrolisis.

Perbandingan hasil hidrolisis CMC menggunakan enzim selulase bebas dan enzim selulase terimobilisasi dapat dilihat pada Tabel 4.11.

Tabel 4. 10 Hasil Hidrolisis CMC Menggunakan Enzim Selulase Bebas dan Enzim Selulase Terimobilisasi

Jenis Enzim	Pemisahan dengan sentrifugasi	Pemisahan dengan pengendapan selama 4-5 jam
	Massa Gula (mg)	Massa Gula (mg)
Bebas	2,168	1,239
Terimobilisasi	0,873	1,271

Dari Tabel 4.11 pada pemisahan dengan sentrifugasi dapat dilihat bahwa hidrolisis CMC menggunakan enzim selulase terimobilisasi menghasilkan lebih sedikit gula reduksi dibandingkan hidrolisis CMC menggunakan enzim selulase bebas. Hal ini dikarenakan berkurangnya aktivitas enzim selulase terimobilisasi dibandingkan dengan enzim selulase bebas. Berkurangnya nilai aktivitas enzim selulase terimobilisasi diduga karena terjadinya faktor pembagian (*partitioning*). Penambahan matriks *chitosan* membuat enzim mengalami pembagian (*portioning*) dan mengurangi aktivitas awalnya. Klibanov (1983) dalam Said, Muljono (1989) menyatakan bahwa enzim terimobilisasi umumnya mempunyai aktivitas yang lebih rendah dibanding dengan enzim bebasnya. Terdapat beberapa hambatan yang terjadi jika enzim berada dalam bentuk imobil. Hambatan yang menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas pada enzim imobil antara lain, pengaruh pembagian (*partitioning*), pengaruh hambatan difusi dan pengaruh hambatan sterik.

Sedangkan untuk pemisahan dengan pengendapan selama 4-5 jam terlihat bahwa hidrolisis CMC menggunakan enzim selulase terimobilisasi menghasilkan lebih banyak gula reduksi dibandingkan dengan menggunakan enzim selulase bebas. Hal ini diduga disebabkan oleh meningkatnya aktivitas enzim yang diakibatkan oleh imobilisasi itu sendiri. Aktivitas enzim meningkat dikarenakan semakin banyaknya bagian aktif enzim yang terbuka (Cesar Mateo, 2007). Perubahan konformasi ini terjadi karena reaksi asam amino yang bersangkutan dengan senyawa pengikat atau matrik penyangga yang ditambahkan (Suhartono 1989).

Dari Tabel 4.11 dapat dilihat bahwa hasil hidrolisis dengan menggunakan enzim selulase terimobilisasi yang dipisahkan dengan pengendapan lebih baik dibandingkan dengan sentrifugasi. Hal ini karena nilai protein yang terimobilisasi juga berbeda yaitu 66,538% dengan pengendapan dan 26,407% dengan sentrifugasi. Nilai enzim selulase terimobilisasi lebih banyak pada pemisahan dengan pengendapan disebabkan enzim

selulase yang telah terimobilisasi terlepas pada saat proses sentrifugasi. Hal ini juga diduga karena pemisahan kurang sempurna yang menyebabkan *supernatant* mengandung kontaminan dari padatan sehingga mempengaruhi nilai absorbansi yang diperoleh.

IV.6.2 Hidrolisis Sabut Kelapa

Proses hidrolisis sabut kelapa dilakukan menggunakan enzim selulase yang diimobilisasi dengan *chitosan* nanopartikel. Kondisi operasi dari proses hidrolisis ini adalah pada suhu 60°C dengan pH 7 (Anwar et al, 2011). Proses hidrolisis dilakukan selama 48 jam dengan waktu pengambilan sampel pada jam ke 1, 8, 16, 24, 32, 40 dan 48.

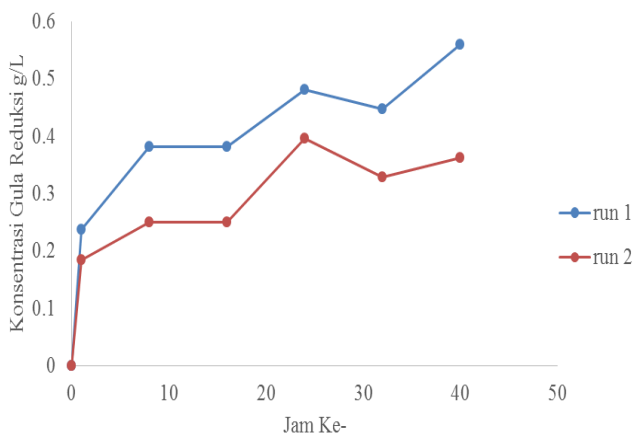
Proses hidrolisis dilakukan dengan memasukkan sabut kelapa yang telah mengalami proses *pretreatment* sebanyak 1 gram dan enzim selulase terimobilisasi ke dalam erlenmeyer 50 mL. Kemudian ditambahkan *buffer* fosfat 0,02 M pH 7 ke dalam erlenmeyer hingga volumenya 40 mL. Setelah itu erlenmeyer yang berisi sabut kelapa dan enzim selulase terimobilisasi dimasukkan ke dalam *incubator shaker* pada suhu 60°C dengan kecepatan 125 rpm selama 24 jam. Selanjutnya hasil hidrolisis dianalisis kadar glukosanya dengan menggunakan metode DNS.

Analisis konsentrasi gula reduksi dalam hidrolisat dengan metode DNS dilakukan pada setiap sampel pada jam ke 1, 8, 16, 24, 32, 40 dan 48. Analisis DNS yang digunakan sama dengan analisis gula reduksi yang dilakukan saat pengujian aktivitas enzim selulase terimobilisasi. Sampel sebanyak 1 mL diambil dengan menggunakan pipet volume lalu dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian ditimbang dengan neraca analitis sehingga memiliki masa gabungan (*microtube* + larutan + tutup) yang sama antara tube 1 dengan tube 2 pada *centrifuge* nantinya.

Karena proses sentrifugasi dilakukan dengan *centrifuge* kecil maka ketelitian penimbangannya adalah 0,01 gram. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C. Proses sentrifugasi ini

bertujuan untuk memisahkan antara padatan (solid) dari sabut kelapa dengan larutan (*supernatant*) pada hidrolisat. Setelah itu sebanyak 0,2 mL larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan pipet volume kemudian ditambahkan 1,8 mL aquadest dan 3 mL DNS. Selanjutnya campuran tersebut divorteks agar tercampur rata kemudian dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 10 menit dan didinginkan dalam air es (4°C) selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Perhitungan kadar gula reduksi dilakukan dengan mengalikan absorbansi dengan slope kurva standar glukosa tanpa CMC.

Hidrolisis dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Sampel pada jam ke-48 tidak dapat dianalisis lagi karena sudah menggumpal. Berdasarkan analisis yang telah dilakukan diperoleh hasil seperti psds Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Selulase Terimobilisasi

Gambar 4.10 menunjukkan bahwa konsentrasi gula reduksi mengalami peningkatan pada jam ke 1 hingga jam ke 8, kemudian mengalami penurunan hingga jam ke 16. Pada jam ke 24 mengalami peningkatan, menurun pada jam ke 32 dan meningkat lagi pada jam ke 40. Peningkatan konsentrasi gula reduksi ini menunjukkan bahwa enzim selulase terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel dapat menghidrolisis sabut kelapa menjadi gula reduksi. Pada penelitian Sanchez-Ramirez (2016) yang menggunakan *chitosan magnetic nanoparticle* untuk menghidrolisis *Agave atrovirens*, nilai gula maksimum yang didapat sekitar 6 g/L dengan protein terimobilisasi juga sekitar 66 % tetapi aktivitas *free enzyme* yang diimobilisasi lebih besar yaitu 875.3 U/mL (Sanchez-Ramirez et al, 2016). Pada penelitian ini, aktivitas enzim yang dipakai 15,339 U/mL dan hasil gula maksimum yang didapat 0,560 g/L. Berdasarkan dari hasil gula reduksi yang diperoleh, penelitian ini layak untuk dikembangkan.

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan hasil analisa yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. *Chitosan* nanopartikel dapat dibuat dengan metode *ionotropic gelation* dengan *gelation agent* natrium sulfat, di mana *chitosan* nanopartikel yang diperoleh berukuran antara kurang dari 20 nm hingga lebih dari 200 nm, dengan jumlah terbanyak adalah *chitosan* nanopartikel dengan ukuran kurang dari 20 nm.
2. Massa *chitosan* nanopartikel yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh volume *buffer* fosfat tiap sekali pencucian.
3. Jumlah protein enzim selulase terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel sebesar 66,5380%
4. Sabut kelapa dapat dikonversi menjadi gula reduksi melalui proses hidrolisis enzimatik menggunakan enzim selulase murni dari *Trichoderma reesei* terimobilisasi pada *chitosan* nanopartikel.

V.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah

1. Perlu dicari kondisi optimum dalam melakukan imobilisasi enzim agar hasil yang didapatkan lebih baik.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk proses pemisahan antara enzim terimobilisasi dengan substrat solid dengan penambahan magnet ke dalam *chitosan* nanopartikel.
3. Perlu dilakukan perbandingan *gelation agent* menggunakan natrium tripolifosfat.

Halaman Ini Sengaja Dikosongkan

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, Reinu E., Verma, Madan L., Barrow, Colin J., Puri, Munish. 2014. "Suitability of magnetic nanoparticle immobilized cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass", *Journal of Biotechnology for biofuels* 7-90.
- Ahamed, A., Patrick Vermette, P. 2008. "Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions". *Biochemical Engineering Journal* 40:399–407.
- Al-Remawi, M.M.A. 2012. "Properties of Chitosan Nanoparticles Formed Using Sulfate Anions as Crosslinking Bridges". *American Journal of Applied Sciences* 9 (7): 1091-1100.
- Anwar, N., Widjaja, A., Winardi, S. 2011, "Study of The Enzymatic Hydrolysis of Alkaline Pretreated Rice Straw Using Cellulase of Various Sources and Compositions", *International Review of Chemical Engineering* Vol. 3.N.2.HAL.
- Arsyimelati, Iskandar, D. 2015. Sintesis Kitosan Suksinat dari Kitosan dan Suksinat Anhidrid Serta Karakteristiknya. *Jurnal Teknologi Technoscientia* Vol. 7 No. 2.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia, Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Biro, Emese., Agnes Sz., Csaba, Sisak., Feczko, Tivadar., Gyenis, Janos., 2008. "Preparation of Chitosan Particles Suitable for Enzyme Immobilization"., *Journal of biochemical and biophysical methods* 70: 1240-1246.
- Bradford M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Reproduction Research Laboratories, Department of*

- Biochemistry, University of Georgia, Athens, Georgia 30602.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. 1997. "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carrier". *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 63, 125–132.
- Cao, S., Aita, G.M. 2013. "Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse". *Bioresource Technology* 131 (2013) 357–364.
- Cheng, Cheanyeh; Kuo-Chung Chang. 2013. "Development of Immobilized Cellulase Through Functionalized Goldnano-particles for Glucose Production by Continuous Hydrolysis of Waste Bamboo Chopsticks" *Chemistry and Research Center for Analysis and Identification Journal Chungli* 32023, Taiwan.
- Chibata. 1978. "Immobilized Enzymes, Research and Development." Halsted Press, New York.
- Datta, Rathin. 1981. "Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-Acid Yield and Conversion of Components". *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 23, 2167-2170.
- Douglas B. Rivers, George H. Emert, 1998, "Factor Affecting The Enzymatic Hydrolysis of Bagasse and Rice Straw", *Biological Waste* 26:58-95, Auburn University Press, Alabama, USA.
- El-Ghaffar, M.A.Abd., Hashem, M.S.. 2010. "Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization". Department of Polymers and Pigments, National Research Center, Tahrir St., Dokki, Giza, Egypt.

- Fouda, M. M. G. 2005. Use of Natural Polysaccharides in Medical Textile Applications. Disertasi. Fachbereich Chemie Universitas Duisburg-Essen. Germany.
- Gunam, I.B.W., Antara, N.S. 1999. "Study on Sodium Hydroxide Treatment of Corn Stalk to Increase Its Cellulose Saccharification Enzymatically by Using Culture Filtrate of *Trichoderma reesei*". Gitayana, Agric Technol. J, S (1) : 34-38.
- Haryanto, T., D. Suheryanto. 2004. "Pemisahan sabut kelapa menjadi serat kelapa dengan alat pengolahan (*defibring mechine*) untuk usaha kecil". Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses. ISSN: 1411-4216.
- Hermiati, E, Mangunwidjaja, D., Sunarti, T.C., Suparno, O, Prasetya, B. 2010. "Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol". Jurnal Litbang Pertanian 24(4).
- Hidayat, M.R. 2013." Teknologi Pretreatment Bahan Lignoselulosa dalam Proses Produksi Bioetanol". Biopropal Industri Vol. 4 No. 1
- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., dan Howard, S., 2003, "Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 12, hal. 602-619.
- Ibrahim, M. 1998. "Clean Fractionation of Biomass - Steam Explosion and Extraction". Faculty of The Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Ikram-ul-haq, M. M. J, Tehmina S. K., dan Zafar Siddiq. 2005. "Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *trichoderma viride*", *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3):241-245.
- Jorgensen, H., Kristensen, J.B., dan Felby, C., 2007. "Enzymatic Conversion of Lignocellulose into Fermentable Sugars:

- Challenges and Opportunities. Biofuels”, Bioproducts & Biorefining, Volume 1, 119-134.
- Kim S. F. 2004.’ Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols”. Tesis. Departement of Food Science Louisiana State University.
- Kulp K. 1984. “Teknologi Pengolahan Jerami sebagai Makanan Ternak”. Bandung: Yayasan Dian Grahita.
- Kumar, M. N. 2000. “ A Review of Chitin and Chitosan Applications, Reactive and Functional Polymers”. Vol 46, Hal. 1-27.
- Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. 2009. “Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production”. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729.
- Kusumawati, N. 2009. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Sebagai Bahan Baku Pembuatan Membran Ultrafiltrasi. FMIPA Universitas Negeri Surabaya.
- Lehninger A.L. 1993. “Dasar-dasar Biokimia Jilid I”, Terjemahan Maggy Thenawijaya. Jakarta: Erlangga.
- Linder, M., Teeri, T. 1997. “The Role and Function of Cellulose Binding Domains”. *Journal Biotechnology*, 57:15-28.
- Liu, Jingjing and Cao, Xuejun., Rao, Mala., Mishra, Chitra., “Properties of penicillium funiculosum cellulase immobilized on a soluble polymer”, *Biotechnology Letters* Vol 6 No 5: 319-322a.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2007. “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques”. *Enzyme and Microbial Technology* 40.
- Maziyah, N, Rahmah, L.N. 2016. “Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa Menggunakan *Crude* Enzim Terimobilisasi”.

- Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M..2005. "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass". *Bioresource Technology*, 96(6): 673-686.
- Muchtadi, D.N., S. Palupu, M. Astawan. 1992. "Enzim Dalam Industri Pangan". Institut Pertanian Bogor.
- Mulcahy. 1996. "An Investigation of Cellulose-binding Domains in Non-Cellulolytic Enzymes". Final Year Project University of Limerick.
- Nadia, L.M.H., Suptija, P., Ibrahim, B. 2014. "Produksi dan Karakterisasi Nano Kitosan dari Cangkang Udang Windu dengan Metode Gelasi Ionik". *JPHPI* 2014, Volume 17, Nomor 2.
- Octavia, S., Soerawidjaja, T.H., Purwadi, R., Putrawan, L.D.G.A., 2011. "Review : Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi". Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan". Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia. Yogyakarta.
- Prawitwong, P. Kosugi, A., Takamitsu, A., Lan Deng., *et al.* 2012." Efficient Ethanol Production from Separated Parenchyma and Vascular Bundle of Oil Palm Trunk". *Bioresource Technology* 125 : 37-42.
- Said, E.G., Muljono, J. 1989. "Biokonversi". Bogor: Dinas Pendidikan dan Kebudayaan, DIKTI, Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Sanchez-Ramirez, J., Martinez-Hernandez, J.L., Segura-Ceniceros, P., Lopez, G., Saade, H., Medina-Morales, M.A., Ramos-Gonzalez, R., Aguilar, C.N., Ilyina, A.

2016. "Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for *Agave Atrovirens* lignocellulosic biomass hydrolysis". Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Bioprocess Biosyst Eng.
- Sangian, H.F., Kristian, J., Rahma, S., Dewi, H., Puspasari, D., Agnesty, S., Gunawan, S., Widjaja, A. (2015). Preparation of Reducing Sugar Hydrolyzed from High-Lignin Coconut Coir Dust Pretreated by the Recycled Ionic Liquid [mmim][dmp] and Combination with Alkaline. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 10 (1): 8-22.
- Schacht, C., Zetzl, C., & Brunner, G. (2008). From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46, 299-321.
- Smith, J.E. 1993. "Prinsip Bioteknologi". Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Suhartono. M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Suhartono. M.T. 1991. Protease. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. 2008. "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review". *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (9): 1621-1651.
- Tiyaboonchai, W. 2003 . "Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery". *Naresuan University Journal* 11 (3): 51-66.
- Trevan, M.D. 1980. "Immobilized Enzymes, An Introduction and Application in Biotechnology". New York: John Wiley & Sons.
- Wahyono, D., Sugita, P., Ambarsari, L. 2010. "Sintesis nanopartikel kitosan dengan metode ultrasonikasi dan

- sentrifugasi serta karakterisasinya”. Prosiding Seminar Nasional Sains III. Bogor.
- Widjaja, Arief. 2009. “Aplikasi Bioteknologi pada Industri Pulp dan Kertas”, itspress, Surabaya.
- Widjaja, A., Gunawan, S., Purwanti, A., Rahmatullah, A., Ramadhan, A.G.G., Hermawan, A.D. 2013. “Pengaruh Variasi pH Dalam Proses Fermentasi Bagas Tebu Menjadi Gas Hidrogen Menggunakan *Enterobacter Aerogenes*”. Prosiding Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses, Undip, Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
- Yang, Bin, Dai, Ziyu, Ding, Shi-You, Wyman, Charles, E., “Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass”. 2011. *Biofuels* 2(4), 421-450.

APPENDIKS A

A-1

PERHITUNGAN KADAR SELULOSA, HEMISELULOSA, DAN LIGNIN PADA SABUT KELAPA MENGGUNAKAN METODE DATTA & RATHIN

Tabel A.1.1 Data Massa Pada berbagai Tahapan Metode Datta

Variabel	Massa (g)				
	A	b	c	d	E
<i>Untreated</i>	1,0000	0,8493	0,6594	0,4359	0,0048
<i>Pretreatment</i> NaOH 1%	1,0005	0,7997	0,5729	0,3373	0,0015

A.1.1 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Sebelum *Pretreatment*

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,6594-0,4359)/1,0000 \times 100\% \\ &= 22,35\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,8493-0,6594)/1,0000 \times 100\% \\ &= 18,99\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,5729-0,0015)/1,0000 \times 100\% \\ &= 43,11\%\end{aligned}$$

A.1.2 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Setelah *Pretreatment* NaOH 1%

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,5729-0,3373)/1,0005 \times 100\% \\ &= 23,55\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,7997-0,5729)/1,0005 \times 100\% \\ &= 22,67\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,3373-0,0015)/1,0005 \times 100\% \\ &= 33,56 \%\end{aligned}$$

Hasil perhitungan kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin sabut kelapa pada berbagai variabel ditampilkan pada tabel berikut.

Tabel A.1.2 Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Sebelum dan Setelah *Pretreatment*

Variabel	Kadar (%)		
	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
<i>Untreated</i>	22,35	18,99	43,11
<i>Pretreatment</i> NaOH 1%	23,55	22,67	33,56

A-2

PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA UNTUK MENGUKUR AKTIVITAS ENZIM

$$\begin{aligned}\text{Massa glukosa} &= 0,3735 \text{ gram} \\ \text{Volume buffer sitrat pH 5,5} &= 100 \text{ ml} \\ \text{BM glukosa} &= 180 \text{ gram/mol} \\ \text{Mol glukosa} &= \text{massa glukosa/BM} \\ &= 0,3735 \text{ gram} / 180 \text{ gr/mol} \\ &= 0,002075 \text{ mol} \\ &= 2075 \mu\text{mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{mol glukosa/ volume buffer sitrat} \\
 &\text{pH } 5,5 \\
 &= 2075 \mu\text{mol}/100 \text{ ml} \\
 &= 20,75 \mu\text{mol}/\text{ml}
 \end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{20,75 \mu\text{mol}/\text{mL} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}$$

$$= 4,15 \mu\text{mol}/\text{mL}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Berikut adalah hasil kurva standar glukosa.

Tabel A.2.1 Data Konsentrasi dan Absorbansi Glukosa pada Kurva Standar Glukosa untuk Mengukur Aktifitas Enzim

Larutan Glukosa 0,024 M (mL)	Buffer (mL)	V total (mL)	Konsentrasi $\mu\text{mol}/\text{mL}$		Absorbansi
			Di tabung	Di kuvet	
0	5	5	0	0	0.000
1	4	5	4.15	0.166	0.068
2	3	5	8.3	0.332	0.137
3	2	5	12.45	0.498	0.232
4	1	5	16.6	0.664	0.308
5	0	5	20.75	0.83	0.426

Setelah diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapatkan persamaan $y = 51,647x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) dan x sebagai absorbansi.

A-3

PERHITUNGAN AKTIVITAS ENZIM

Perhitungan Aktivitas Enzim Selulase dari *T. reesei*

1. Pengukuran aktivitas enzim selulase
 - Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1) = 0,652
 - Absorbansi larutan koreksi (A2) = 0,051
 - Absorbansi larutan setelah koreksi (A) = $A_1 - A_2$
= 0,601
2. Konsentrasi glukosa
 - = A x slope kurva standar glukosa
 - = $0,601 \times 51,647$
 - = $30,679 \mu\text{mol/mL}$
3. Aktivitas enzim selulase (U/mL)
 - = mol glukosa / waktu inkubasi / volume enzim selulase
 - = $30,679 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} / 0,2 \text{ mL}$
 - = $15,339 \text{ U/mL}$

A-4

PERHITUNGAN UJI GULA REDUKSI UNTUK ENZIM TERIMOBILISASI

A.4.1. Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi untuk Uji Imobilisasi dan Hidrolisis

Massa glukosa = 0,3674 gram

Volume buffer sitrat pH 5,5 = 100 mL

Konsentrasi glukosa awal

= massa glukosa/ volume buffer sitrat pH 5,5

= $0,3674 \text{ gram} / 100 \text{ mL}$

= $0,003674 \text{ gram/mL}$

= $3,674 \text{ gram/L}$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$\begin{aligned}
&= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}} \\
&= \frac{3,674 \text{ gram/L} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\
&= 0,7348 \text{ gram/L}
\end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan $y = 6,5904x$ dengan y sebagai konsentrasi gula reduksi ($\mu\text{mol/mL}$) dan x sebagai absorbansi.

A.4.2 Perhitungan Konsentrasi Gula Reduksi untuk Uji Hasil Imobilisasi

Diambil salah satu data absorbansi uji imobilisasi

$$\begin{aligned}
\text{Absorbansi} &= 0,029 \\
\text{Absorbansi (y)} &= 6,5904x \\
\text{Konsentrasi gula reduksi (x)} &= (0,029 \times 6,5904) \\
&= 0,1911216 \text{ g/L}
\end{aligned}$$

A-5

PERHITUNGAN BRADFORD (PENGUKURAN KADAR PROTEIN)

A.5.1. Perhitungan Kurva Standar Bradford

1. Membuat larutan standar bovine serum albumin (BSA)

$$\begin{aligned}
\text{Massa BSA} &= 0,1 \text{ gram} \\
\text{Volume aquades} &= 100 \text{ ml} \\
\text{Konsentrasi BSA} &= \frac{\text{massa BSA}}{\text{volume aquades}} \\
&= \frac{0,1 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} \\
&= \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} \\
&= 1 \text{ mg/ml}
\end{aligned}$$

2. Membuat larutan NaCl 0,15 M

$$\begin{aligned}
\text{BM NaCl} &= 58,44 \text{ gram/mol} \\
\text{Massa NaCl} &= 5,844 \text{ gram}
\end{aligned}$$

Volum aquades = 666 ml
 Konsentrasi NaCl = $\frac{\text{mol NaCl}}{\text{Volum pelarut}}$
 = $\frac{(\text{Massa NaCl} / \text{BM NaCl})}{(\text{Volum Pelarut (ml)} / 1000 \text{ ml})}$
 = $\frac{(5,844 \text{ gram} / 58,44 \text{ gram/mol})}{(666 \text{ ml} / 1000 \text{ ml})}$
 = 0,15 M

Kemudian dari tiap-tiap BSA diencerkan dengan konsentrasi 0,1 hingga 1. Hasil perhitungannya ditunjukkan pada tabel A.5.1 berikut

Tabel A.5.1 Data Konsentrasi dan Absorbansi Protein dengan BSA pada Kurva Standar Bradford untuk Mengukur Kadar Protein Enzim

Volume BSA (mL)	Volume NaCl (mL)	Volum Dye Reagent (mL)	Konsentrasi	Absorbansi
0	0,1	5	0	0
0,01	0,09	5	0,1	0,09
0,02	0,08	5	0,2	0,130
0,03	0,07	5	0,3	0,218
0,04	0,06	5	0,4	0,303
0,05	0,05	5	0,5	0,337

Kemudian diplot antara konsentrasi BSA dengan absorbansinya untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapatkan persamaan $y = 1,4037x$ dengan y sebagai konsentrasi protein (mg/mL) dan x sebagai absorbansi

A.5.2. Perhitungan kadar protein Enzim Selulase dari *T. reesei* sebelum Imobilisasi

1. Konsentrasi protein

= $A \times \text{slope kurva standar protein (BSA)}$
 = $0,123 \times 1,4037$
 = 0,1726551 mg

2. Konsentrasi protein per mL Enzim Selulase
 - = Konsentrasi protein/volum enzim (mL)
 - = $0,1726551 \text{ mg}/0,05 \text{ mL}$
 - = $3,453102 \text{ mg/mL}$
3. Kadar protein total Enzim Selulase
 - = Konsentrasi protein x volume enzim total sebelum imobilisasi (mL)
 - = $3,453102 \text{ mg/mL} \times 1,7 \text{ mL}$
 - = $6,0015 \text{ mg}$

A.5.3. Perhitungan kadar protein Enzim Selulase dari *T. reesei* setelah Imobilisasi

Diambil sampel kadar protein selulase dalam *supernatant* setelah imobilisasi dengan *chitosan* nanopartikel

1. Konsentrasi protein
 - = A x slope kurva standar protein (BSA)
 - = $0,055 \times 1,4037$
 - = $0,0772035 \text{ mg}$
2. Konsentrasi protein per ml Enzim Selulase
 - = Konsentrasi protein/volum enzim (mL)
 - = $0,0772035 \text{ mg}/0,05 \text{ mL}$
 - = $1,54407 \text{ mg/mL}$
3. Kadar protein total supernatant Enzim Selulase
 - = Konsentrasi protein x volum enzim total sebelum imobilisasi (mL)
 - = $1,54407 \text{ mg/mL} \times 1,3 \text{ mL}$
 - = $2,0077 \text{ mg}$
4. Total protein yang terserap pada membran *chitosan* nanopartikel
 - = Kadar protein sebelum imobilisasi – kadar protein dalam supernatan
 - = $6,0015 \text{ mg} - 2,0077 \text{ mg}$
 - = $3,9923 \text{ mg}$

Untuk perhitungan kadar protein untuk variabel lainnya, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama.

A-6 PERHITUNGAN HIDROLISIS

Perhitungan Konsentrasi dan Massa Gula Reduksi

1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi dari hidrolisis enzim selulase

Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi untuk Hidrolisis telah ditunjukkan pada appendiks A.4.1 dengan persamaan $y = 6,5904x$ dengan y sebagai konsentrasi gula reduksi (g/L) dan x sebagai absorbansi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis enzim selulase pada hidrolisis pertama

Absorbansi = 0,036

Absorbansi (y) = $6,5904x$

Konsentrasi gula reduksi (x) = $(0,036 \times 6,5904)$
 $= 0,2372544 \text{ g/L}$

2. Perhitungan massa gula reduksi dari hidrolisis enzim selulase

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis enzim selulase pada hidrolisis pertama

Konsentrasi gula = $0,2372544 \text{ g/L}$

Volume larutan hidrolisis pertama = 40 mL

Massa gula reduksi = konsentrasi gula x volume larutan
 $= 0,2372544 \text{ g/L} \times (40/1000) \text{ L}$
 $= 0,00949 \text{ gr}$

Perhitungan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

A-7

PERHITUNGAN DATTA DAN RATHIN

	Berat					
Sampel Hasil <i>Pretreatment</i>	a	B	C	d	E	
<i>Unpretreatment</i>	1,0000	0,8493	0,6594	0,4359	0,0048	
NaOH 1% 16 Hour	1,0005	0,7997	0,5729	0,3373	0,0015	
	% Kadar					
Sampel Hasil <i>Pretreatment</i>	Selulosa	Hemi- selulosa	Lignin	Ekstrak	Abu	Total
<i>Unpretreatment</i>	22,35	18,99	43,11	15,07	0,48	100
NaOH 1% 16 Hour	23,55	22,67	33,56	20,07	0,15	100

A-8

PERHITUNGAN AKTIVITAS ENZIM SELULASE

Absorbansi				Slope	Konsentrasi	Konsentrasi (mg/ml)	Aktifitas (unit/ml)	Rata- Rata
A1	A2	A3	A					
0.126	0.126	0.125	0.126	1.404	0.176	3.52872	15.520	15.339
0.121	0.12	0.12	0.120	1.404	0.169	3.37896	15.158	

A-9

A-9
PERHITUNGAN KADAR PROTEIN TERIMOBILISASI PADA BERBAGAI MASSA PROTEIN

	A1	A2	A	Slope	Konsentrasi (mg/mL)	Konsentrasi dalam reagen (mg/mL)
6 mg	0.056	0.054	0.055	1.404	0.0772	1.5444
9 mg	0.078	0.092	0.085	1.404	0.1193	2.3868
12 mg	0.072	0.077	0.075	1.404	0.1046	2.0920
15 mg	0.080	0.077	0.079	1.404	0.1102	2.2043

	Volume Reagen (mL)	Protein Sisa (mg)	Protein Terimobilisasi (mg)	% terimobilisasi
6 mg	1.3	2.0077	3.9923	66.5380
9 mg	1.92	4.5827	4.4173	49.0816
12 mg	2.56	5.3554	6.6446	55.3715
15 mg	3.2	7.0537	7.9463	52.9754

A-10
PERHITUNGAN HIDROLISIS SABUT KELAPA
A-11

Waktu	Enzim	A	Slope	Konsentrasi ($\mu\text{mol/ml}$)	Slope	Konsentrasi (g/L)	Massa (g)
Jam Ke-8	<i>T.Reesei</i> 1	0.058	36.613	2.124	6.590	0.382	0.009938
	<i>T.Reesei</i> 2	0.038	36.613	1.391	6.590	0.250	0.006511
Jam Ke-16	<i>T.Reesei</i> 1	0.058	36.613	2.124	6.590	0.382	0.009173
	<i>T.Reesei</i> 2	0.038	36.613	1.391	6.590	0.250	0.00601
Jam Ke-24	<i>T.Reesei</i> 1	0.073	36.613	2.673	6.590	0.481	0.010584
	<i>T.Reesei</i> 2	0.060	36.613	2.197	6.590	0.395	0.008699
Jam Ke-32	<i>T.Reesei</i> 1	0.068	36.613	2.490	6.590	0.448	0.008962
	<i>T.Reesei</i> 2	0.050	36.613	1.831	6.590	0.330	0.00659
Jam Ke-40	<i>T.Reesei</i> 1	0.085	36.613	3.112	6.590	0.560	0.010083
	<i>T.Reesei</i> 2	0.055	36.613	2.014	6.590	0.362	0.006524

PERHITUNGAN HIDROLISIS CMC

<i>Free Enzyme</i>	Enzim	A	Slope	Konsentrasi ($\mu\text{mol/mL}$)	Slope	Konsentrasi (g/L)
	<i>T.Reesei</i> 1	0.123	36.613	4.5034	6.5904	0.81062
	<i>T.Reesei</i> 2	0.118	36.613	4.32033	6.5904	0.77767
Imobilisasi	Enzim	A	Slope	Konsentrasi ($\mu\text{mol/mL}$)	Slope	Konsentrasi (g/L)
	<i>T.Reesei</i> 1	0.029	36.613	1.06178	6.5904	0.19112
	<i>T.Reesei</i> 2	0.024	36.613	0.87871	6.5904	0.15817

BIODATA PENULIS 1



Viktor Adrian, lahir di Surabaya tanggal 18 Mei 1995, merupakan anak tunggal dari pasangan Bapak Harry Santosa dan Ibu Lily Sutjiati. Penulis menempuh pendidikan formal di SDK Santo Carolus Surabaya, SMPK Santo Carolus Surabaya dan SMAK St. Louis 1 Surabaya. Setelah lulus dari SMA, penulis melanjutkan studi di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS untuk jenjang Strata I. Penulis memiliki hobi membaca, dan melukis. Pada akhir studi, penulis mengerjakan Tugas

Penelitian **“Pembuatan *Chitosan* Nanopartikel untuk Imobilisasi Enzim dalam Rangka Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa”**. Penulis melakukan penelitian Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. dan Afan Hamzah S.T. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

BIODATA PENULIS 2



Raja Panal Simanullang, lahir di Sidikalang tanggal 23 April 1995, merupakan anak pertama dari empat bersaudara dari pasangan Bapak Viktor H. Simanullang dan Ibu Tiurma Batubara. Penulis menempuh pendidikan formal dari SD ST. Yosef di Sidikalang, SMP N 1 Sidikalang dan SMA di SMA 1 Sidikalang. Setelah lulus dari SMA, penulis melanjutkan studi di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS untuk jenjang Strata I. Penulis memiliki hobi membaca novel, dan menonton. Pada akhir studi, penulis mengerjakan Tugas Penelitian **“Pembuatan *Chitosan* Nanopartikel untuk Imobilisasi Enzim dalam Rangka Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa”**. Penulis melakukan penelitian Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. dan Afan Hamzah S.T. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.